

Relatório Final De Estágio
Mestrado Integrado Em Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE COINFEÇÃO DE FIV, FELV E
MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS (*MYCOPLASMA HAEMOFELIS* E *M.
HAEMOMINUTUM*) EM GATOS DOMÉSTICOS NA ZONA NORTE DE
PORTUGAL**

Patrícia Sofia Mesquita Azevedo

Orientador

Prof. Dr. Armando José Lemos

Co-Orientadores

Dr. Ricardo Pimenta

Dr.^a Cláudia Carvalho

Porto, 2017

Relatório Final De Estágio
Mestrado Integrado Em Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE COINFEÇÃO DE FIV, FELV E
MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS (*MYCOPLASMA HAEMOFELIS* E *M.
HAEMOMINUTUM*) EM GATOS DOMÉSTICOS NA ZONA NORTE DE
PORTUGAL**

Patrícia Sofia Mesquita Azevedo

Orientador

Prof. Dr. Armando José Lemos

Co-Orientadores

Dr. Ricardo Pimenta

Dr.^a Cláudia Carvalho

Porto, 2017

Agradecimentos

A realização deste projeto só foi possível pela orientação, estímulo, empenho e colaboração de todos o que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua materialização.

Começo por distinguir o professor doutor Armando Lemos, meu orientador, a quem muito agradeço a sua disponibilidade para integrar este projeto e todo o seu apoio e motivação.

Um muito obrigada ao Dr. Ricardo Pimenta, diretor clínico do Centro Veterinário de Adaúfe, com quem tive o grato prazer de estagiar naquele Centro Veterinário, onde me orientou e ajudou dispensando o apoio e atenção necessários.

Relevantes agradecimentos à minha co-orientadora Dr.^a Cláudia Carvalho, à Professora Dr.^a Berta Silva, D. Sandra e a toda equipa do laboratório de imunogenética, pelo apoio fantástico que me deram e por tudo que me ensinaram. Um especial obrigada à Dr.^a Andreia, que prontamente ajudou em todo o trabalho de estatística e análise de dados.

No projeto estiveram envolvidas várias clínicas/hospitais veterinários, sediados na região Norte (Porto e Braga), que colaboraram disponibilizando as amostras de sangue para este trabalho, pelo que com muito apreço expresso os meus reconhecidos agradecimentos.

Para o Dr. Rui e toda a equipa do BSA (Banco De Sangue Animal), pela disponibilidade e colaboração dispensadas, nomeadamente com amostras e dicas, ferramentas indispensáveis na persecução deste projeto, os meus agradecimentos.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, com uma vivência peculiar que muito me motivou desde sempre; era ainda criança e dizia já que o meu sonho era “ser médica dos animais”, não deixando nunca de me apoiarem com a sua presença, continuamente acompanhando o meu percurso académico, contribuindo e incentivando para que aquele sonho fosse um dia tornado realidade e que agora, também eles, celebram comigo.

A toda a minha família pelo carinho e orgulho que sempre tiveram em mim, e por sempre acreditarem que o meu sonho se tornaria realidade. Ao meu namorado e companheiro que me acompanhou em todos os momentos bons e maus ao longo deste percurso de quase seis anos, em que também partilhou a paixão pela área da medicina veterinária, demonstrando e dedicando especial predileção por gatos e seus cuidados.

Agradeço ainda aos meus amigos de sempre, em particular à Cátia, pela sua presença, mesmos nos momentos em que sentia estar longe de alcançar o meu sonho e ser bem-sucedida. Todos sempre me acompanharam, manifestando interesse e partilhando bons momentos, ajudando e dando ânimo. Para todos, pela presença, pela partilha e comunhão de paixões, expresso os meus mais amistosos agradecimentos.

Às minhas amigas e colegas, em especial a Cristina, Sara e MJ, por me acompanharem sempre, pela motivação, pela partilha, pela paixão comum e incentivo demonstrados em todos os meus projetos e ambições, o meu muito obrigado.

Aos meus Jam, Milka, Petit, Rover, Sissi, Maria e Silver, fiéis companheiros e presenças permanentes, que fazendo parte do meu crescimento individual e da minha formação académica, comigo passaram longas horas de estudo proporcionando momentos felizes, agradeço a dádiva dessa vivência, por com ela ter aprendido muito. Aos mais recentes companheiros, Moustache e Mini Sissi, Dama e Bela, agradeço também a sua presença e partilha de momentos de companhia.

A todos os gatinhos que passaram por mim e ajudei, que hoje são felizes e sadios, aos outros que infelizmente não consegui ajudar, que ficam em memória, pois foram especialmente estes que me fizeram apaixonar a cada dia pelos felinos, fazendo despertar o meu grande interesse pela medicina felina, agradeço pela companhia e motivação, sementes que alimentaram a paixão pela medicina veterinária.

O dia seguinte, continua a ser o sonho.

O amor e a paixão, bases para a continuação do longo caminho a percorrer.

A todos muito Obrigada.

Resumo

O impacto das infeções por retrovírus e micoplasmas é bem conhecido e é cada vez maior na prática de medicina felina. No entanto, em Portugal os estudos epidemiológicos são escassos e restritos à zona centro do país. A importância destas retroviroses é grande quer em felinos domésticos de ambiente interior ou gatos domésticos adotados de rua. Esta importância deve-se à capacidade dos vírus (FIV e FeLV) de originarem doenças neoplásicas, alterações hematológicas, imunossupressão e serem de fácil disseminação. A infeção por micoplasmas é igualmente importante em medicina felina pois é causa de anemia e imunossupressão. O contágio entre estas populações pode estar dependente da prevalência de cada um destes agentes (FIV, FeLV e *Mycoplasma* sp.).

Neste estudo foram testados para FIV, FeLV, *Mycoplasma haemominutum* e *M. haemofelis* 128 gatos da zona norte de Portugal (Porto, Braga e Viana do Castelo). Dividiu-se em dois grupos, “recentemente adotados”, em que se enquadram gatos provenientes da rua há menos do que dois meses e/ou que tenham acesso ao exterior público; “gatos *indoor*” em que se enquadram gatos que não têm acesso ao exterior.

Pretende-se avaliar a prevalência e coinfeção entre os agentes e os fatores de riscos para ocorrência de infeção, tentando perceber quais os grupos mais suscetíveis à exposição e desenvolvimento da doença, tendo em conta os fatores idade no momento do teste, sexo, plano de desparasitação e vacinação, habitat e proveniência do animal.

Na população estudada a prevalência de FIV foi 6% e FeLV 2% o que está de acordo com estudos anteriormente descritos em Portugal. Não foi possível identificar *M. haemofelis*, no entanto sabe-se que da população testada 16 (12%) são *M. haemominutum* positivos, o que está em concordância com os últimos estudos realizados em Portugal.

Abstract

Retroviral and mycoplasma species infections have a well-known and increasing impact in feline medicine. However, a limited number of epidemiological studies have been conducted in Portugal, and those which exist are restricted to the centre of the country. Retroviral diseases are relevant in both domestic and stray cats due to the ability of the viruses FIV and FeLV to cause neoplastic diseases, haematological changes, and immunity suppression. Mycoplasma species infections are also important in feline medicine because they cause anemia and immunity suppression. It is thought that the disease spread between these feline populations may be dependent on the prevalence of each of these agents (FIV, FeLV and *Mycoplasma sp.*).

This project aims to assess the prevalence of disease agents and their mutual influence, as well as to determine risk factors for occurrence of infection. The susceptibility of different groups to disease exposure and development is investigated, considering the age at the time of the tests, sex, deworming and vaccination plans, habitat, and origin of the animal subjects.

In this project, 128 cats of Northern Portugal (Porto, Braga and Viana do Castelo) were tested for FIV, FeLV, *M. haemominutum* and *M. haemofelis*. The population sample was divided into two groups: “recently adopted” for cats adopted less than two months ago and/or that have access to outdoors, and “indoor” for cats with strictly no access to the street environment.

The results indicated that 6% of the population was infected with FIV and 2% with FeLV, which is in accordance with previous studies conducted in Portugal. It has not been possible to track *M. haemofelis*. However, it was found that 12% of the tested population (i.e. 16 cats) are *M. haemominutum* positive, which agrees with the last study conducted in Portugal.

Índice geral

| | |
|--|-----------|
| I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 1 |
| FELV – VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA | 1 |
| 1. Agente | 1 |
| 2. Transmissão | 1 |
| 3. Patogenia | 1 |
| 4. Classificação da infecção | 2 |
| 5. Sinais clínicos | 3 |
| 6. Diagnóstico | 5 |
| 6.1. Métodos diretos | 5 |
| 6.2. Métodos indiretos (deteção de anticorpos) | 6 |
| 6.3. Diagnósticos complementares | 6 |
| 7. Prevalência | 6 |
| 8. Tratamento | 7 |
| FIV – VÍRUS DA IMUNODEFICIENCIA FELINA | 7 |
| 1. Agente | 7 |
| 2. Transmissão | 7 |
| 3. Fases de infecção | 8 |
| 4. Sinais clínicos | 8 |
| 5. Prevalência | 9 |
| 6. Diagnóstico | 10 |
| 7. Tratamento | 11 |
| MICOPLASMAS | 12 |
| 1. Agentes | 13 |
| 2. Transmissão | 13 |
| 3. Sinais clínicos | 14 |
| 4. Diagnóstico | 15 |
| 4.1. Diagnósticos complementares | 15 |
| 5. Prevalência | 16 |
| 6. Tratamento | 17 |
| II – OBJETIVOS | 18 |
| III – MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 1. População e amostra | 18 |
| 2. Material e métodos | 20 |
| 3. Análise estatística | 21 |
| IV – RESULTADOS | 21 |
| V – DISCUSSÃO | 23 |
| VI – CONCLUSÃO | 26 |
| VII– BIBLIOGRAFIA | 26 |

Lista de siglas e abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
aPTT: Tempo de tromboplastina parcial
ARN: Ácido Ribonucleico
AZT: Zidovudina
BID: De 12 em 12 horas
BSA: Banco de Sangue Animal
CID: Coagulação Intravascular Disseminada
ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
FeLV: Vírus da Leucemia Felina
FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
IFA: Imunofluorescência indireta
IM: Intra-muscular
IP: Intra-peritoneal
ITU: Infecção do trato urinário inferior
IV: Intra-venoso
LN: Linfonodos
mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro
MO: Medula óssea
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PO: “*Per os*” – por via oral
RIM: Rapid Immuno Migration
rRNA: Ácido Ribonucleico ribossômico
RT-PCR: *Real Time Polymerase Chain Reaction*
SID: De 24 em 24 horas
UV: Ultra-violeta
TID: De 8 em 8 horas
TT: Tempo de trombina
WB: Western Blot
VGM: Volume globular médio

I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FELV – VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA

1. Agente

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um *retrovírus* da subfamília *oncornavirus* (Watanabe *et al.* 2013, Hartmann 2015). É um vírus RNA que quando penetra numa célula é transcrito em DNA (provírus) e integrado no genoma celular. O gene *env* é o responsável pela sua patogenicidade (Watanabe *et al.* 2013). Foi isolado pela primeira vez em 1964 segundo Fenner *et al.* (1993).

Várias estirpes ocorrem naturalmente no FeLV exógeno: FeLV - A, - B, - C e - T. A sua distinção genética é feita por diferenças na sequência no gene *env* e por interações com os recetores necessários para a entrada na célula (O'Brien *et al.* 2012). Recentemente foi descoberto o subtipo - D. O FeLV - A é o predominante, no entanto é fracamente patogénico (Watanabe *et al.* 2013, O'Brien *et al.* 2012). Os subgrupos patogénicos são gerados por mutação ou por recombinação na região *env* entre o subgrupo tipo A exógeno e as sequências provirais endógenas (O'Brien *et al.* 2012).

2. Transmissão

Pode ocorrer transmissão horizontal, via saliva, mordeduras, arranhões, “*grooming*” mútuo, partilha de gamelas e caixas de areia (Hartmann 2015, O'Brien *et al.* 2012). Está descrito que o principal método de transmissão é através da mordedura (Fenner *et al.* 1993). É possível ocorrer através das fezes e leite (Major *et al.* 2010). Pode ocorrer infeção vertical transplacentária (Stojanovik & Foley 2011), em que o vírus endógeno é, normalmente, o responsável (Fenner *et al.* 1993). Na maioria das vezes, a gravidez de gatas FeLV positivas resulta em morte embrionária, morte fetal ou em gatinhos com virémia regressiva. Em gatas lactantes infetadas geralmente a transmissão não ocorre durante a gravidez. Há uma pequena probabilidade de os gatinhos se poderem tornar virémicos persistentes após o nascimento e, neste caso, a infeção ocorre a partir de glândulas mamárias, onde o vírus pode permanecer latente até que a glândula se desenvolva durante o último período de gravidez (Lutz *et al.* 2009).

O contacto por si só não é garantia de infeção. A resposta imunitária do felino tem uma variável individual (Stonajovik & Foley 2011). É necessária uma grande carga viral ou exposição prolongada. A saliva apenas excreta 10⁶ virões infetantes (Fenner *et al.* 1993).

3. Patogenia

A suscetibilidade à infeção por FeLV depende do sistema imunitário e da idade do animal, do estado imunitário, do subtipo e da carga viral, da presença de outras doenças e da concentração viral com a qual o animal é afetado. A ação dos linfócitos T citotóxicos é determinante. A infeção é crónica e desenvolve-se em várias fases, caracterizando-se inicialmente por um longo período assintomático (Hartmann 2012).

O vírus inicia a sua replicação na orofaringe (Melo *et al.* 2015), e de seguida replica-se nos linfócitos (preferencialmente nos linfócitos B), monócitos e macrófagos, baço e gânglios mesentéricos. Posteriormente alastra para células precursoras de medula óssea, invadindo a

corrente sanguínea ao libertar plaquetas e leucócitos infectados. Tem tropismo para linfócitos T, sendo que as glicoproteínas do envelope viral dependem desta ligação (Gómez & Guida 2010). De acordo com os vários estágios de progressão da infecção, vários autores referem as seguintes etapas: 1º Estágio - 1 a 4 dias: ocorre replicação em tecidos linfóides circunjacentes ao local de exposição (amígdalas, linfonodos faríngeos); 2º Estágio - 2 a 14 dias: infecção de pequenas populações de macrófagos e linfócitos B circulantes; 3º Estágio - 3 a 21 dias: replicação do vírus ocorre no baço, tecido linfóide associado ao intestino, células precursoras da medula óssea, células epiteliais das criptas intestinais, linfonodos; 4º Estágio - 14 a 28 dias: virémia periférica – o vírus é incorporado nos neutrófilos e plaquetas derivados da MO; 5º Estágio: 28 a 56 dias – infecção epitelial e glandular disseminada: ocorre excreção do vírus na saliva e urina (Hartmann 2012, Gómez & Guida 2010, Rand 2006, Nascimento 2004).

Com o auxílio de métodos de diagnóstico como PCR, estudos recentes forneceram novos dados sobre o curso da infecção, levando à evidência de que gatos considerados imunes após a infecção permanecem provírus positivos. Gatos que testaram antígeno negativo, foram testados através de PCR e diagnosticados como provírus positivo. São, portanto portadores de FeLV. Esta informação é especialmente relevante considerando que gatos antígeno negativo podem ser provírus positivos e não excretar o vírus, mas se eventualmente ocorrer reativação, nesse momento é possível que volte a ocorrer excreção viral e o felino passar a ser uma fonte de contágio para outros indivíduos (Hartmann 2012).

Com base nestas informações, surge uma nova proposta de classificação, em que as fases de infecção por FeLV são definidas como: infecção abortiva (comparável a "gatos regressores"), infecção regressiva (comparável a "virémia transitória"), infecção progressiva ("virémia persistente"), e infecção focal ou atípica (Hartmann 2012).

4. Classificação da infecção

A infecção por FeLV pode ser classificada de diferentes formas tendo em conta a evolução da infecção no animal, e baseia-se na capacidade dos animais infectados conseguirem ou não conter o vírus e neutralizá-lo. Na infecção abortiva imediatamente após a infecção, o vírus começa a replicar-se em tecido linfóide da orofaringe. Em alguns gatos imunocompetentes a replicação viral é suprimida por uma resposta imune humoral e celular e estes nunca se tornam virêmicos. Vão apresentar níveis elevados de anticorpos neutralizantes e não é possível detetar o antígeno de FeLV nem o RNA viral ou ADN no sangue em nenhum momento da infecção. A infecção regressiva desenvolve-se na sequência de uma resposta imune eficaz e a replicação do vírus fica contida na medula óssea. O vírus propaga-se através de células mononucleares infectadas. Os gatos têm resultados positivos em testes que detetam antígeno livre no plasma (ELISA) e eliminam vírus, principalmente na saliva. Esta virémia normalmente dura semanas ou meses. Depois de cerca de três semanas de virémia, células da medula óssea podem ser infectadas e as células precursoras hematopoiéticas desenvolvem granulócitos e plaquetas infectadas que circulam no corpo. Mesmo se as células da medula óssea forem infectadas, uma determinada

percentagem dos gatos é capaz de eliminar a virémia. Ainda assim, não conseguem eliminar completamente o vírus do organismo, mesmo depois da fase virémica terminada porque a informação para a replicação do vírus (DNA proviral) está presente em células estaminais da medula óssea. A base molecular de latência é a integração de uma cópia do genoma viral (provírus) no DNA cromossómico celular e embora esse DNA proviral esteja presente no genoma celular, nenhum vírus é produzido ativamente. Os gatos com infeção regressiva podem ter resultados negativos em todos os testes que detetam antígeno FeLV. Durante a divisão celular, o DNA proviral é replicado e assim as linhagens de células completas podem conter DNA proviral de FeLV. No entanto, o DNA proviral não é traduzido em proteínas, e não há partículas virais infecciosas, e assim, os gatos infetados regressivamente não excretam FeLV. Métodos de PCR sensíveis podem detetar provírus no sangue dos gatos com infeção regressiva que são antigénio-negativos. A infeção pode ser reativada porque a informação para a produção de partículas virais completas está presente e podem ser reativados quando diminui a produção de anticorpos (por exemplo, depois de imunossupressão); na infeção progressiva o vírus do FeLV não é contido no início da infeção. Ocorre a replicação do vírus em primeiro lugar nos tecidos linfóides, seguindo-se pela medula óssea, mucosas e tecidos epiteliais glandulares. Estes gatos permanecem persistentemente virémicos e são infecciosos a outros gatos para o resto de sua vida. Desenvolvem doenças associadas ao FeLV e a maioria morre dentro de poucos anos. Infeções progressivas e regressivas podem ser distinguidas por testes repetidos para o antigénio viral no sangue periférico. Gatos infetados regressivamente vão-se tornar negativos no máximo 16 semanas após a infeção, enquanto os gatos infetados progressivamente permanecerão positivos. Inicialmente ambas infeções são acompanhadas pela persistência de DNA proviral no sangue detetadas por PCR, mas mais tarde estão associadas com diferentes cargas de FeLV quando medido por PCR quantitativo. A infeção regressiva está associada com carga viral baixa e a progressiva com alta carga. As infeções focais ou infeções atípicas são raras em campo e são caracterizadas por uma replicação viral persistente em locais atípicos (por exemplo, nas glândulas mamárias, bexiga e olhos). Esta replicação pode levar à produção intermitente ou de baixo grau de antigénios e estes gatos podem ter resultados positivos ou fracamente discordantes em testes de antigénios ou até mesmo haver alternância de positivo e negativo (Nascimento 2004, Hatmann 2012).

5. Sinais clínicos

Os diferentes subgrupos podem causar diferente sintomatologia (Hartmann 2012, Quinn *et al.* 2011). As três principais manifestações são imunossupressão, anemia não regenerativa e doenças imunomediadas (Ramsey & Tennant 2010).

O subtipo associado à imunossupressão é o FeLV – T, tornando os animais mais suscetíveis a infeções. Surgem estomatites, gengivites, lesões na pele, abscessos SC (Anexo I – Imagem I), doenças respiratórias crónicas e mau aspeto do pêlo apresentando-se baço e sem brilho (Nascimento 2004, Fenner *et al.* 1993; Quinn *et al.* 2011). Esta imunossupressão caraterizada

por linfopenia persistente é induzida pela apoptose do vírus sobre as células linfocitárias (Ramsey & Tennant 2010). Associam-se coinfeções, como por exemplo toxoplasmose e micoplasmose (Fenner *et al.* 1993).

O subtipo FeLV – C está mais relacionado com o aparecimento de anemia (Quinn *et al.* 2011). A anemia associada a FeLV pode ser regenerativa (devido a infecção simultânea com *Mycoplasma haemofelis*, trombocitopenia imunomediada, anemia hemolítica imunomediada) ou não regenerativa (aplasia eritrocitária pura, mielocítica, mielofibrose, osteosclerose medular, hemorragia tumoral). No entanto, a mais característica é aplásica pura, sem leucopenia, não regenerativa e sem trombocitopenia (Ramsey & Tennant 2010).

Um dos tipos mais frequentes de tumores em gato são os linfomas, e cerca de 30% de gatos com este tipo de tumor são FeLV positivos, sendo este agente considerado a principal causa de linfossarcoma em gatos (Fenner *et al.* 1993). Esta sintomatologia aparece normalmente em gatos infectados conjuntamente com subtipo A e B (Quinn *et al.* 2011). Os linfomas podem ocorrer no tecido linfóide (multicêntrico), no timo ou mediastino, característicos particularmente em gatinhos e é o subtipo mais comum (cerca de 90%); no trato gastrointestinal e linfonodos mesentéricos sendo característico de animais mais velhos; extra-nodal, o mais raro, causa tumores em tecidos não linfóides como a pele, olhos e sistema nervoso central (Fenner *et al.* 1993, Ramsey & Tennant 2010). Predominantemente são tumores dos linfócitos T, exceto o alimentar - linfócitos B (Fenner *et al.* 1993). Estudos recentes indicam que o FeLV pode estar envolvido no aparecimento de linfomas em gatos recuperados de infecção (Ramsey & Tennant 2010).

Outro tipo de manifestação em animais com FeLV pode ser doença mieloproliferativa - leucemia (Fenner *et al.* 1993, Ramsey & Tennant 2010). No entanto, apesar da doença ter por nome “leucemia” são raros os gatos que associado a infecção por FeLV desenvolvem esta patologia (Ramsey & Tennant 2010).

Podem ocorrer glomerulonefrites (devido ao aumento dos níveis de antígenos do vírus há formação e deposição de imunocomplexos), problemas reprodutivos (diminuição da performance, infertilidade, aborto, fetos mortos) e distúrbios nervosos (Fenner *et al.* 1993, Ramsey & Tennant 2010). Incontinência urinária que pode estar associada ou não com anisocoria e outras lesões oculares estão também reportadas, provavelmente devido à ação do vírus sob o tecido nervoso (Gómez & Guida 2010).

Problemas gastrointestinais como vômitos e/ou diarreia também podem ser encontrados devido a infecções oportunistas como criptosporidiose, giardíase, salmonelose ou linfoma. Está descrita uma enterite clínica histologicamente semelhante a panleucopenia, provavelmente secundária a infecção por coronavírus entérico (Rand 2006).

Em relação ao hospedeiro, o fator principal é a idade no momento da infecção. Os gatos recém-nascidos desenvolvem marcada atrofia do timo resultando em imunossupressão grave, geralmente fatal. Em gatos adultos, observa-se uma resistência progressiva normalmente

passando por infeções regressivas ou abortivas, sendo que os sintomas tendem a ser mais ligeiros no caso de se desenvolver a forma progressiva (Hartmann 2012).

6. Diagnóstico

6.1. Métodos diretos

Em relação ao diagnóstico do FeLV, estes são os métodos preferíveis. A maioria dos testes de rotina baseia-se na deteção do antígeno p27 livre e não do anticorpo. Estes métodos incluem deteção de antígeno de FeLV livre (RIM e ELISA), deteção de componentes do gene *gag* (IFA), deteção directa do antígeno viral por PCR nos quais se deteta o provírus (DNA) ou vírus (RNA) e isolamento viral (Nascimento 2004).

O teste ELISA baseia-se na deteção de antígeno p27 FeLV no soro, plasma ou sangue total (Hartmann 2015, Nascimento 2004, Hartmann 2012, Ramsey & Tennant 2010). A sua sensibilidade é de cerca de 90% e a especificidade de 98%. No entanto, apesar de ser o método mais escolhido na prática clínica, um só resultado positivo não permite distinguir os diferentes tipos de infeção, sendo necessário repetir o teste ou utilizar um outro método de diagnóstico para confirmação. Também é de notar que só produz resultados positivos de uma a duas semanas após infeção. O método de imunocromatografia (RIM) funciona de forma semelhante ao ELISA e é o método normalmente utilizado como primeira abordagem, comercializado em “kits” de fácil e rápida utilização na própria clínica (Ramsey & Tennant 2010). Qualquer gato que seja positivo num destes testes serológicos deve ser confirmado com IFA, ou imediatamente isolado e retestado novamente com o mesmo método de diagnóstico passado 4-6 semanas, principalmente se for um gato assintomático (Rand 2006).

O teste de imunofluorescência (IFA) da medula óssea ou esfregaços sanguíneos permite a deteção de proteínas expressas pelo gene *gag*. No entanto são necessárias 6 a 8 semanas para um resultado positivo após a infeção, pois exige que haja envolvimento da medula óssea (Nascimento 2004).

O teste com maior sensibilidade é o isolamento viral de linfócitos T, permitindo a deteção do vírus numa fase bastante inicial de infeção, sendo para tal identificado e isolado o vírus do FeLV no soro, no entanto é um método muito trabalhoso e não está disponível por rotina (Levy et al. 2008, Ammersbach & Bienzie 2011, Ramsey & Tennant 2010).

As técnicas de PCR e RT-PCR podem ser utilizadas para deteção e quantificação de provírus (DNA) ou para deteção de RNA viral. A deteção de RNA pode ser realizada através de sangue, soro, saliva ou fezes. No entanto, gatos que tenham já ultrapassado a fase de virémia podem ser negativos neste teste e ainda assim serem provírus positivo (Ramsey & Tennant 2010).

A técnica de RT-PCR para deteção de provírus permite a quantificação. É útil em casos inconclusivos de diagnóstico serológico ou em gatos que exibem sintomatologia patognomónica de FeLV mas o resultado dos testes serológicos é negativo (Gómez & Guida 2010).

Uma vez que estes métodos de diagnóstico utilizam a deteção de antígeno e não de anticorpos, podem ser testados gatos de todas as idades, sem correr o risco de falsos positivos devido a

anticorpos maternos (Ettinger & Feldman 2010). No entanto, é comum que gatinhos infectados tenham uma seroconversão mais atrasada, que pode durar desde poucas semanas a meses, podendo resultar em falso-negativos num teste inicial, por esta razão (Gómez & Guida 2010). Podem ocorrer resultados falso-negativos se os gatos estiverem com linfopenia severa, uma vez que, o vírus está intimamente interligado com os linfócitos T (Nascimento 2004). Se não houver proteína p27 livre suficiente pode resultar num falso positivo, por exemplo, casos de gatos jovens ou que tenham sido resgatados da rua ou mordidos por outros gatos recentemente, uma vez que esta proteína só atinge níveis detetáveis no sangue a partir das 2 semanas pós-infecção, e pode demorar até 3 meses (Gómez & Guida 2010).

Estes testes não devem ser realizados imediatamente após a vacinação pois pode induzir um resultado falso positivo, uma vez que o sangue recolhido nessa altura pode conter restos de antígenos vacinais (Hartmann 2012).

6.2. Métodos indiretos (detecção de anticorpos)

Os testes indiretos raramente são utilizados na prática clínica devido às suas limitações, pois devido à vacinação podem ser de difícil interpretação e podem testar falso positivo se aplicados a gatos com infeções abortivas. O método de vírus neutralização e a detecção de anticorpos contra antígenos da membrana associado a *oncoronavirus* felino (AMCOF) são exemplos deste tipo de testes de diagnóstico (Ramsey & Tennant 2010).

6.3. Diagnósticos complementares

Num aspirado de medula óssea de um gato FeLV positivo podemos encontrar displasia medular. Esta amostra também pode ser utilizada como base para teste de IFA. A análise do líquido pleural frequentemente revela linfoblastos, alto teor proteico e altas contagens celulares totais. A citologia por aspiração pode revelar linfoblastos em órgãos hiperatrofiados e massas abdominais (Nascimento 2004). Gatos com FeLV podem desenvolver anemia e é importante diferenciar se é regenerativa ou não regenerativa. No esfregaço sanguíneo é possível a observação de normoblastos (Ramsey & Tennant 2010). No leucograma pode haver uma neutropenia devido à supressão da medula óssea ou à destruição imunomediada destas células. Podemos também notar um aumento de enzimas hepáticas e de bilirrubina sérica (Rand 2006).

7. Prevalência

O Subtipo FeLV-B é o mais frequente em Portugal, sendo o A também prevalente (Quinn *et al.* 2011). O agente encontra-se distribuído a nível mundial. Esta distribuição é influenciada pela densidade animal e história de exposição prévia (Ramsey & Tennant 2010).

Em Portugal, estudos efetuados na Moita, determinaram que a prevalência desta doença atinge os 10% (Rodrigues 2012), enquanto, dois estudos efetuados em Lisboa, um determinou que esta seria de 10,9% e o outro estudo obteve resultados semelhantes, calculando que a prevalência seria cerca de 10,2% (Turras 2014). Um estudo mais recente em Lisboa refere a prevalência de gatos infectados com FeLV através de testes rápidos de 8%, sendo 5,7% destes resultados

confirmados por PCR. Estes resultados indicam uma prevalência mais baixa de FeLV nesta população do que aquela descrita em Portugal anteriormente (Fernandes 2016).

A prevalência da infecção reportada em gatos saudáveis é de 40%, mas uma vez que a maioria recupera, a prevalência de virémia é cerca de 1 a 2% (Ramsey & Tennant 2010). Os gatos de apartamento sem acesso ao exterior têm prevalência de 1%, aumentando em função do livre acesso ao exterior, sendo que em gatos de colônia pode chegar aos 33% (Fenner *et al.* 1993).

8. Tratamento

O tratamento para FeLV é paliativo e sintomático, devendo-se tratar qualquer desordem neoplásica ou degenerativa, e em caso de infecções oportunistas e recorrentes administração de antibiótico (Quinn *et al.* 2011a).

Em caso de linfoma pode-se recorrer à quimioterapia (Nascimento 2004, Hartmann 2015). O prognóstico para o tratamento quimioterápico de um linfoma associado a FeLV é igual a um linfoma não associado a essa doença. E, neste caso apesar do linfoma ser eliminado o animal continua infetado com o vírus do FeLV (Ramsey & Tennant 2010).

A terapia antiviral quimioterápica apenas deve ser aplicada em último recurso devido à alta toxicidade destas substâncias e também à falta de evidências de eficácia. O protocolo quimioterápico normalmente utilizado é o COP (ciclofosfamida, vinscristina e prednisolona) (Hartmann 2015). Outros fármacos antivirais podem ser utilizados, como o interferão ómega e AZT (Hartmann, 2015, Quinn *et al.* 2011).

FIV – VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA

1. Agente

O FIV é um retrovírus, específico de espécie (Nascimento 2004). Foi isolado pela primeira vez em 1986 (87) na Califórnia por Pederson (Fenner *et al.* 1993, Nascimento 2004, Quinn *et al.* 2011). Pertence ao género *Lentivírus*, denominando-se assim devido à sua evolução crónica com longos períodos de incubação e virémia persistente. É composto por genes adicionais acessórios que conferem capacidade de latência. Para além destes genes são compostos por outros genes comuns a todos os retrovírus: genes *gag* que codificam as proteínas da cápside, nucleocápside e matriz; o gene *pol* codifica a protease, integrase e transcriptase reversa; o gene *env* codifica as proteínas de envelope, nomeadamente, as glicoproteínas virais gp120 e gp41 que são as principais determinantes da diversidade antigénica dos subtipos do vírus (Bendinelli *et al.* 1995, Hosie *et al.* 2009). A glicoproteína gp41 é a que tem maior importância em termos de diagnóstico uma vez que os testes se baseiam na sua deteção. Este vírus é semelhante ao vírus HIV em todas as suas características. No entanto, o contágio é apenas entre felinos, não estando descrito nenhum contágio humano (Nascimento 2004).

2. Transmissão

O FIV está presente no sangue, saliva e outros fluídos corporais. No entanto, a principal via de transmissão é por inoculação parenteral do vírus, presumivelmente, através de feridas ou

mordeduras (Nascimento 2004, Hosie *et al.* 2009). Pode também ser transmitido por via transplacentária, uma vez que o aparelho reprodutor feminino contém linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas que são células pelas quais o vírus tem alto grau de tropismo, embora seja raro acontecer por esta via em circunstâncias naturais (Hartmann 2012, Nascimento 2004, Fenner *et al.* 1993, Gómez & Guida 2010). Está descrita a possibilidade de transmissão da infeção em gatinhos *in útero* ou durante o parto especialmente se a fêmea estiver em fase aguda (Quinn *et al.* 2011a). Está descrito que o leite materno tem altas cargas virais, superiores às do plasma, sugerindo que possa ser uma fonte de infeção para neonatos. No entanto, a maioria das progenitoras infetadas transmite apenas anticorpos no leite, levando à obtenção de falsos positivos quando as crias são testadas, antes dos 6 meses de idade, por métodos de diagnóstico indiretos (O'Neil *et al.* 1995, O'Neil *et al.* 1996, Little 2012, Litster 2014).

Presume-se que uma elevada mortalidade em neonatos FIV positivos ou infeções rapidamente progressivas nestes animais possam provocar uma subestimação da transmissão *in útero* e neonatal na natureza (O'Neil *et al.* 1995, O'Neil *et al.* 1996, Coats 2005).

Excreção viral no sêmen e secreções vaginais ocorrem de forma cíclica. Apesar de estar indicado o coito como forma de contágio, este risco é muito reduzido (Gómez & Guida 2010). Há maior risco de infeção em machos meia-idade e idosos com acesso ao exterior (Nascimento 2004). A condição de macho inteiro está referida como um fator de risco, sendo considerados quatro vezes mais suscetíveis do que gatos jovens, e três a quatro vezes mais infetados do que fêmeas (Hosie *et al.* 1989, Levy *et al.* 2006, Levy *et al.* 2008, Bande *et al.* 2012).

3. Fases de infeção

Registam-se quatro fases de infeção por FIV: aguda, que dura em média entre 3 a 4 semanas após infeção e é quando ocorre a seroconversão. Os animais apresentam febre, depressão, disfunção gastrointestinal, estomatite e linfadenomegália periférica. Em alguns gatos esta fase pode passar despercebida (Nascimento 2004c, Quinn *et al.* 2011a, Bienzle *et al.* 2013); assintomática de duração indefinida. A concentração de vírus no sangue é muito pequena, mas a multiplicação continua a ocorrer nos tecidos infetados (Ramsey & Tennant 2010); numa terceira fase ocorre supressão das funções dos linfócitos T e B, resultando numa anormalidade na resposta imune mediada por células e humoral: linfopenia, neutropenia e hiperglobulinémia (Ramsey & Tennant 2010); a doença terminal caracteriza-se por infeções oportunistas, ou neoplasias (Nascimento 2004c, Ramsey & Tennant 2010).

4. Sinais clínicos

A sintomatologia do FIV pode variar consoante a idade, estirpe, dose infetante, via de transmissão e exposição concomitante a outros agentes (White *et al.* 2011).

Os sinais clínicos apresentados podem dever-se tanto à infeção como ser uma consequência do síndrome de imunodepressão associado a esta infeção viral. As infeções oportunistas dão sintomatologia variada como perda de peso, letargia, inapetência, linfadenopatia, febre, gengivite, estomatite (Anexo I – Imagem II), secreção ocular crónica, diarreia crónica (Fenner *et*

al. 1993, Ramsey & Tennant 2010, Del Fierro *et al.* 1995). Nesta fase pode ocorrer neutropenia. Estes sinais clínicos são transitórios e são visíveis normalmente durante alguns dias ou semanas, podendo ser vistos na fase primária da infecção por FIV (Hosie *et al.* 2009). As infecções oportunistas concomitantes mais frequentes são: virais por FCV, *poxvirus felino* e *herpesvírus*; bacterianas como clamidiose; fúngica por *Microsporum canis*; por protozoários como a toxoplasmose (Ramsey & Tennant 2010); por micoplasmas (Nascimento 2004c).

Estão relatadas também apresentações incomuns tais como doença parasitária da pele (demodecose e pediculose) e aparecimento de tumores. Estes são sinais importantes que devem alertar o clínico para a possibilidade da infecção por FIV (Hosie *et al.* 2009).

O FIV é responsável pela imunodeficiência tornando o gato mais suscetível a infecções secundárias e neoplasia ou estimulação imunológica resultando em doença imunomediada. Em casos mais raros, pode até provocar doenças neurológicas (Hosie *et al.* 2009).

Pensa-se que a gengivoestomatite crônica seja o sinal clínico mais comum reportado porque como prejudica a qualidade de vida dos gatos leva os donos à clínica (Tenorio *et al.* 1991).

A infecção por FIV também se relaciona com ocorrência de falha reprodutiva (Weaver *et al.* 2005).

O envolvimento renal devido a lesões glomerulares e túbulo-intersticial associados com proteinúria grave é uma ocorrência frequente em gatos infetados com FIV (Poli *et al.* 2012).

Estes animais estão mais predispostos a linfoma (Ramsey & Tennant 2010). Os linfomas mais comuns são os das células B em que há extensa proliferação de linfócitos B que se verifica nos primeiros estágios de infecção (Ramsey & Tennant 2010, Callanan *et al.* 1996). É comum também a ocorrência de doença mieloproliferativa e carcinoma de células escamosas (Hartmann 2012).

Numa fase final, animais infetados com FIV podem apresentar linfoma ou leucemia, disfunção neurológica, oftalmopatia inflamatória e doença renal inespecífica (Nascimento 2004, Hosie *et al.* 2009). Os gatos infetados geralmente permanecem assintomáticos durante um período de tempo prolongado antes da manifestação de problemas associados com o desenvolvimento da imunodeficiência. Este período pode durar anos na maioria dos casos (Addie *et al.* 2000), sendo que alguns gatos nunca irão desenvolver sinais clínicos relacionados com o FIV (Hosie *et al.* 2009). Outros animais têm uma progressão muito rápida dos sinais clínicos. Verifica-se que o que mais comumente acontece nestes animais é que à medida que os níveis de linfócitos descem e com o decorrer da infecção, os sinais tornam-se mais frequentes e severos, até o animal entrar na fase terminal (Richards 2005).

A partir do momento em que apresentam sintomas, gatos infetados com FIV, revelam neutropenia, linfopenia, anemia, monocitose, trombocitopenia, hiperglobulinemia, azotemia, aumento de enzimas hepáticas, hipercolesterolemia e hipoglicemia (Ramsey & Tennant 2010, Rand 2006, Nascimento 2004).

A nível da coagulação pode-se verificar aPTT, TT aumentados e CID. Pode ocorrer trombocitopenia secundária a outros processos ou devido a neoplasia megacariocítica (Rand 2006).

5. Prevalência

O FIV apresenta uma distribuição mundial altamente variável e foi já isolada de outras espécies felinas para além do gato doméstico (Hosie *et al.* 2009).

O vírus da imunodeficiência felina pode ser detetado entre 1 a 30% em gatos doentes (Fenner *et al.* 1993), sendo que em outros estudos o número aumenta para 44% (Quinn *et al.* 2011). A prevalência do vírus em gatos saudáveis varia entre 1 a 14% e estes animais permanecem infetados durante toda a vida. O grupo de animais com maior prevalência são machos adultos com acesso ao exterior (Quinn *et al.* 2011).

Existem 7 subtipos de vírus identificados até à data, denominados de A a F e U, distinguidos com base na sequência de aminoácidos que codifica o gene responsável pela diferente patogénese e progressão clínica (Quinn *et al.* 2011). No entanto, a maioria dos isolados é A ou B. Os subtipos descobertos mais recentemente foram os F e U, respetivamente nos EUA e Nova Zelândia (Sodora *et al.* 1993, Kakinuma *et al.* 1995) - (Anexo I – Imagem III).

No Reino Unido a prevalência é de 13 a 19% em doentes e 2 a 3% em gatos saudáveis, havendo maior prevalência em gatos machos de meia-idade ou velhos com acesso ao exterior (Ramsey & Tennant 2010). Nos EUA a prevalência varia entre 3,5 a 24% e em Madrid 8,3% em gatos saudáveis, e 13,8% em doentes (Rand 2006).

Alguns países, sobretudo norte da Europa, apresentam uma baixa prevalência, enquanto em Itália, apresenta taxas que podem atingir os 30%. Segundo os autores, pode-se relacionar este valor com a alta taxa de animais errantes no país (Bandecheii *et al.* 2006).

Em Portugal há apenas estudos realizados na zona centro, Lisboa. Um estudo realizado em 2009 apresenta uma prevalência de 18% (Rosado 2009). Mais tarde, baixa para 10% (Duarte *et al.* 2010) e em 2014 8% (Turras 2014). Em 2016 um outro estudo aponta para uma prevalência de 2,7% (Fernandes 2016). Na Moita verificou-se uma prevalência de cerca de 22% em gatos errantes (Rodrigues 2012).

Apesar de todos os estudos recorrentes, a prevalência do vírus é difícil de ser calculada por diversos motivos como, o uso de vários métodos de testagem de diagnóstico, inexistência de base de dados partilhada e inexistência de regime voluntário de testagem. No entanto, segundo a informação publicada, a prevalência de FIV depende de vários fatores como o estilo de vida (acesso ou não ao exterior), sexo e idade (Levy *et al.* 2006).

6. Diagnóstico

A infeção por FIV leva à produção de anticorpos contra diversos antígenos virais, sendo esse um processo valioso para a utilização de métodos indiretos para a deteção do agente, embora estes não consigam distinguir os anticorpos produzidos pela infeção dos vacinais ou dos maternos (Amersbach & Bienzle 2011). As crias de mães infetadas têm anticorpos até 16 semanas, por isso é possível a ocorrência de falsos resultados nos testes realizados durante esse período (Ramsey & Tennant 2010). Num estudo efetuado em 2004 os anticorpos maternos do FIV não interferiam a partir das 12 semanas de idade (MacDonald *et al.* 2004). Há autores

que referem que os testes devem ser realizados a partir dos 6 meses, uma vez que, apesar de ser rara a ocorrência de infecção através das mães, muitos apresentam até essa idade os anticorpos maternos (Amersbach & Bienzie 2011).

Os testes não devem ser realizados antes das 16 semanas após mordedura de um animal suspeito ou confirmadamente infetado com FIV, correndo o risco de haver um falso negativo por ainda não ter ocorrido seroconversão (Ramsey & Tennant 2010).

A bibliografia refere que 10% dos gatos infetados por FIV não apresenta níveis de anticorpos detetáveis, por isso, devem ser retestados. As razões desta falha podem ser devidas a infecção inicial, colapso imune terminal, carência relativa/absoluta de anticorpos ou falha no teste a detetá-los (Ramsey & Tennant 2010). Os anticorpos estão presentes 2- 4 semanas após a infecção e, por isso durante esse período pode haver falsos negativos (Fenner *et al.* 1993).

Os métodos de diagnósticos mais utilizados são indiretos e estão disponíveis sob a forma de testes rápidos em “kits” comerciais serológicos de ELISA e RIM, permitindo a deteção de anticorpos contra p24 da cápside e gp41 do envelope do FIV (Ramsey & Tennant 2010). Nestes testes faz-se deteção de anticorpos e não de antígeno uma vez que os últimos podem não estar circulante (Nascimento 2004).

O método indireto *Western Blot* (WB) deteta anticorpos contra proteínas específicas virais. É o “gold standard” para deteção de infecção por FIV e por isso deve ser utilizado como método de confirmação quando os resultados são inconclusivos (Amersbach & Bienzie 2011, Hosie *et al.* 2009).

O método mais utilizado para confirmação ou em gatos com menos de 6 meses é o PCR (Amersbach & Bienzie 2011, Little 2012), sendo muito útil para a identificação da presença de FIV. Deteta DNA proviral com uma sensibilidade entre 41 a 93% e uma especificidade entre 81 a 100% em gatos não vacinados e um pouco mais baixa em vacinados. A estirpe do vírus condiciona a eficiência do teste, tendo uma maior sensibilidade para o subtipo A (Slater *et al.* 2005, Levy *et al.* 2008, Amersbach & Bienzie 2011, Bienzie *et al.* 2013).

Pode ocorrer que os resultados entre os testes ELISA e PCR sejam contraditórios. Positivo no ELISA e negativo no PCR explica-se por falta de especificidade do PCR para a estirpe ou o animal poderá ter menos do que 6 meses de idade e assim, ter resultado num falso positivo no teste ELISA. Se ELISA for negativo e PCR positivo pode acontecer que o animal tenha sido infetado mas ainda não tenha decorrido um período suficiente para ocorrência de seroconversão (Gómez & Guida 2010, Rand 2006).

7. Tratamento

Quando um gato é testado e é positivo ao FIV deve-se proceder à eutanásia ou isolamento. Em casas com vários gatos em que é impossível para os donos isolarem o animal infetado pode-se optar por realizar o “toque de recolher noturno”. Pensa-se que se isolarmos o animal do anoitecer ao amanhecer diminui o risco de interação e assim o risco de contágio (Ramsey & Tennant 2010).

O tratamento pode ser não específico para o vírus, mas sim realizado de acordo com os sinais clínicos (Fenner *et al.* 1993). O AZT é o principal medicamento utilizado para o tratamento de FIV. É um inibidor competitivo da transcriptase reversa (Fenner *et al.* 1993). No entanto, tem efeitos secundários como depleção da medula óssea e hepatotoxicidade. O seu uso deve ser cauteloso. Apesar de não eliminar a infeção, atenua os efeitos da mesma a curto ou médio prazo (Fenner *et al.* 1993). A dose utilizada de AZT SC é de 15mg/kg. No Hospital Escola de Buenos Aires realiza-se um protocolo apenas com AZT ou uma combinação de AZT com ácido valpróico, em caso de sintomatologia neurológica ou de outras alterações (Gómez & Guida 2010). É importante, nestes animais, reduzir a exposição a “stress”, parasitas e a outros agentes causadores de possíveis infeções (Ramsey & Tennant 2010).

Apesar de parecer controverso os glucocorticóides podem apresentar melhorias clínicas (provável efeito anti-inflamatório). No entanto, devem ser utilizados no menor período de tempo possível e numa dose anti-inflamatória (Ramsey & Tennant 2010). Ainda assim, há estudos que referem que no caso de gatos FIV positivos com estomatite associada, os glucocorticóides devem ser evitados, utilizando-se AZT, interferão ómega e extração dentária (Hartmann 2015). Podem ser utilizados imunoestimulantes como interferão-alfa ou omega e *Propionibacterium acnes* (Infermun®). Suplementos alimentares como NN – dimetilglicina parecem ajudar em pacientes imunodeprimidos (Ramsey & Tennant 2010).

Estudos em gatos com FIV que apresentavam neutropenia revelam que a utilização de fator estimulante de colónia de granulócitos humanos recombinante durante um período menor do que 3 semanas pode ser benéfico (Ramsey & Tennant 2010).

Em animais com anemia não regenerativa é uma opção a administração de eritropoietina (alfa e beta). Pode-se recorrer a transfusões de plasma, *pool* de imunoglobulinas humorais ou antissoro específico em gatos com hipoglobulinémia (Ramsey & Tennant 2010).

Noutros estudos, foram utilizados inibidores de protéases como o TL-3, em gatos com sintomatologia neurológica (Gómez & Guida 2010).

MICOPLASMAS

Os micoplasmas hemotrópicos são microrganismos extracelulares pleomórficos com genomas pequenos e que perderam a parede celular, tornando-os dependentes do seu hospedeiro (Duarte *et al.* 2016, Guida & Gómez 2010).

Durante muito tempo os micoplasmas foram incluídos no grupo das *rickettsias*, sendo denominados de “*hemobartonella*”. Classificados como bactérias e depois como parasitas, são agora micoplasmas (Guida & Gómez 2010). Esta classificação baseou-se nos resultados da análise da sequência genética de 16 genes rRNA, e provou-se assim que os hemoplasmas não estão relacionados com a *Bartonella spp.*, que se encontra no interior dos eritrócitos e não causa anemia (Beugnet & Halos 2015).

Estes micoplasmas infetam gatos e podem ser encontrados numa grande variedade de mamíferos, incluindo o ser-humano (Duarte *et al.* 2016). Os micoplasmas felinos parasitam glóbulos vermelhos anexando-se aos mesmos e crescendo sob a sua superfície. Causam anemia hemolítica por destruição extravascular dos eritrócitos pelo sistema fagocitário mononuclear e lise intravascular por lesão direta da membrana e/ou aumento da fragilidade osmótica, razão pela qual a doença é conhecida por anemia infecciosa felina – micoplasmose. Causam doença clínica, especialmente quando associada a outras patologias ou doenças imunossupressoras, tais como FIV ou FeLV (Harvey 2006).

A importância destes agentes na saúde pública é elevada, uma vez que nos últimos anos, algumas espécies de hemoplasmas de espécies animais foram detetadas através do método de PCR em humanos com sinais clínicos, sendo ainda pouco conhecido o seu papel zoonótico. Os humanos que estariam infetados teriam uma coinfeção com *bartonella* ou uma imunodeficiência (Beugnet & Halos 2015).

1. Agentes

Foram identificados, em felinos, três agentes: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus M. haemominutum*, e *Candidatus M. turicensis* (Stojanovik & Foley 2011, Duarte *et al.* 2016). O primeiro era anteriormente conhecido como *Hemobartonella felis* e está relacionado com anemia hemolítica em gatos, enquanto *M. turicensis* e *M. haemominutum* não estão associados com a doença clínica, provocando anemia em gatos imunodeprimidos (Stojanovik & Foley 2011). É pouco comum mas os gatos podem ser infetados por *Candidatus M. haemoparvum* (Beugnet & Halos 2015). Alguns autores consideram que *M. haemofelis* seja a causa de anemia infecciosa felina (Nascimento 2004), enquanto outros consideram ser um microrganismo oportunista associado a outras infeções (Ramsey & Tennant 2010). Este agente usa a glicose como única fonte de energia e contém um amplo número de genes de proteínas de superfície que poderão estar envolvidas na evasão ao sistema imunitário do hospedeiro (Beugnet & Halos 2015). Adere à superfície de eritrócitos maduros causando a sua lise. São conhecidas duas linhagens distintas: uma grande e patogénica; e outra pequena e com pouca virulência (Nascimento 2004, Gómez & Guida 2010). É o micoplasma mais patogénico em gatos. Este agente é pleomórfico, variando de cocos para pequenos anéis, na sua forma e por vezes pode formar cordões de 3-6 microrganismos. O *M. haemominutum* é mais pequeno, normalmente encontra-se isolado em pequenos cocos. No entanto, estes dois agentes, não podem ser distinguidos com base na sua forma, através do exame ao sangue por microscopia (Beugnet & Halos 2015).

2. Transmissão

Experimentalmente está documentada a transmissão IM, IP, IV, transplacentária (Quinn *et al.* 2011, Rand 2006) e também através de contacto sanguíneo, incluindo transfusões sanguíneas (Nascimento 2004). Está descrita também a transmissão perinatal. No entanto, a forma mais comum descrita como fonte principal de contágio é a mordedura, e por isso os gatos mais

acometidos são gatos entre os 1 e 3 anos com acesso ao exterior, embora o mecanismo de transmissão exato seja pouco conhecido (Quinn *et al.* 2011).

Os vetores hematófagos, nomeadamente *Ctenocephalides felis*, são uma forma de contágio para *M. haemofelis* mas não para *M. haemominutum* (Rand 2006).

O FeLV está designado como um cofator no desenvolvimento de anemia infecciosa felina (Ramsey & Tennant 2010). Em zonas onde este vírus é comum cerca de 50% gatos está coinfectado com *Mycoplasma haemofelis* (Rand 2006).

3. Sinais clínicos

A presença de *M. haemofelis* é cíclica. Se há anemia regenerativa justifica o diagnóstico, se não há anemia é um achado accidental, pois pode não ser patogénico (Nascimento 2004).

O período de incubação depois de inoculação intravenosa é de 2 dias a 1 mês, no entanto também se verificou que se a inoculação for SC, o período pode alongar-se até 2 meses (Beugnet & Halos 2015).

Ocorre anemia devido à hemólise extravascular mas em alguns gatos também está descrita a hemólise intravascular. No entanto, anemia não regenerativa não pode ocorrer pois não há supressão da medula óssea (Quinn *et al.* 2011, Nascimento 2004).

A anemia pode dever-se ao dano direto do eritrócito pelo organismo ou através de mecanismos imunomediados que podem ocorrer devido à deteção de aglutininas frias e quentes que aparecem nos gatos infetados, sendo que as aglutininas frias aparecem mais rapidamente (Beugnet & Halos 2015).

Sintomas como febre, depressão, fraqueza, esplenomegalia e icterícia estão associados a este tipo de infeção. A febre pode aparecer associada ou não a anemia hemolítica e é normalmente intermitente. Também pode haver imunossupressão caso a quantidade de micoplasmas seja grande (Rand 2006, Quinn *et al.* 2011). Pode ocorrer taquicardia, sopros e taquipneia compensatória (Gómez & Guida 2010). A hemólise aguda pode estar associada a colapso, hipersalivação, vocalização e sinais neurológicos (Beugnet & Halos 2015).

A micoplasmose felina está induzida em 4 etapas: a primeira em que não há demonstração de sinais clínicos e é chamada de pré-parasitémia ocorre entre 2 a 21 dias após a infeção; a segunda é uma fase aguda e ocorre em 3 semanas a partir do momento de contágio. Pode haver recuperação espontânea e depois recorrência (Rand 2006, Gómez & Guida 2010). Nesta fase ocorre maior mortalidade (Beugnet & Halos 2015); numa terceira fase, de recuperação, ocorrem anemias leves e sinais clínicos pouco evidentes; por último, a fase de portador pode durar entre meses a anos, havendo autores que referem que o período de portador dura até 2 anos. Pode haver recidivas apesar de ser pouco frequente (Guida & Gómez 2010).

Pode haver casos hiperagudos em indivíduos que apresentam anemias graves, morrendo em poucas horas (Gómez & Guida 2010).

Em pacientes com FIV e/ou FeLV podem ocorrer casos muito graves de anemia severa, prostração e emaciação, sem resposta ao tratamento. Neste caso deteta-se uma anemia não regenerativa (Gómez & Guida 2010).

Em gatos sobreviventes, o hematócrito volta ao valor de referência normal ou ao limiar e deixa de ser possível identificar o micoplasma em esfregaços sanguíneos. Nesta fase, podem eliminar a infeção ou ser portadores. Alguns estudos referem que a anemia nestes gatos pode reaparecer se forem sujeitos a “stress”, gravidez, neoplasias, administração iatrogénica de imunossuppressores (Beugnet & Halos 2015).

É de referir que as diferentes espécies de hemoplasmas podem variar na sua capacidade de persistência no hospedeiro, sendo o *M. haemominutum* mais comum em gatos portadores assintomáticos do que o *M. haemofelis* e *M. turiscensis* (Beugnet & Halos 2015).

4. Diagnóstico

A confirmação diagnóstica realiza-se mediante a deteção do parasita sobre a membrana dos eritrócitos. O sangue deve ser colhido na parte interna no pavilhão auricular, desta maneira conseguimos otimizar a probabilidade de encontrar o microrganismo (Gómez & Guida 2010). (Anexo I – Imagem IV). Deve-se proceder à recolha de sangue total sem EDTA pois o anticoagulante pode fazer com que o agente se desagregue dos eritrócitos e impedir assim, a sua visualização. Para coloração do esfregaço não se deve utilizar o corante azul-de-metileno, mas sim o *Giemsa* que tem uma sensibilidade de cerca de 20% (Nascimento 2004, Ramsey & Tennant 2010). O esfregaço deve ser seco ao ar. Esfregaços com estas duas colorações têm que ser observadas a microscópio ótico com luz UV (Ramsey & Tennat 2010).

A parasitémia pode aumentar ou diminuir a cada hora tornando o diagnóstico num achado clínico. Quando há suspeita de anemia infecciosa felina pode ser necessário realizar 7 dias de colheitas consecutivas para que o agente possa ser observável no esfregaço (Ramsey & Tennant 2010), embora haja autores que referem que poderá ir até aos 10 dias (Gómez & Guida 2010).

Em alguns gatos infetados com *M. haemofelis*, podem ocorrer flutuações cíclicas com descidas abruptas no hematócrito e o número de eritrócitos infetados pode variar de 90 a <1% num espaço de apenas 3 horas (Beugnet & Halos 2015). Estas mudanças do hematócrito podem ser explicadas pelo facto de os macrófagos do fígado, baço e pulmões opsonizarem os eritrócitos afetados e estes voltarem novamente à circulação. (Gómez & Guida 2010).

Cerca de 50% dos gatos são falsos negativo aquando da observação do esfregaço, por isso deve ser utilizado PCR para confirmação de diagnóstico. Através deste método é possível distinguir as diferentes espécies de micoplasmas felinos (Rand 2006, Quinn *et al.* 2011).

Muitos protocolos de PCR têm sido realizados até à data, em que todos se baseiam na deteção do gene 16S rRNA e é possível detetar aproximadamente 100 organismos/mL de sangue (Beugnet & Halos 2015).

Outro método de diagnóstico possível é IFA com sangue total. Também recentemente tem havido progressos em relação a testes serológicos e citometria. Os testes serológicos, ainda não estão

disponíveis comercialmente mas demonstram uma alta sensibilidade para detecção de micoplasmas maior do que o PCR (Beugnet & Halos 2015).

4.1. Diagnósticos complementares

Podem ser utilizados métodos de diagnóstico complementares. O “teste de Coombs” positivo, macro ou microaglutinação no hemograma ou a presença de esferócitos é sugestivo da doença (Rand 2006, Nascimento 2004).

Em gatos infetados com *M. haemofelis* verifica-se uma diminuição do VGM, contagem eritrócitos e hemoglobina considerando-se assim haver uma anemia que é regenerativa (Nascimento 2004, Quinn *et al.* 2011, Ramsey & Tennant 2010).

Num esfregaço é possível observar policromasia, anisocitose e corpos de Howell-Jolly. Observa-se também o próprio agente nos eritrócitos em que se visualizam pequenos cocos, anéis ou bastonetes que coram azul. Pode-se verificar um aumento de reticulócitos, no entanto pode não ser perceptível se houver uma imunossupressão ou VGM diminuído (Nascimento 2004). Os corpos de Howell-Jolly e artefactos no esfregaço (precipitados) podem ser confundidos com os micoplasmas, por isso é recomendado a realização da PCR para garantir que não é um falso positivo (Beugnet & Halos 2015).

Os parâmetros na análise bioquímica estão normais na maioria dos casos, exceto a bilirrubina que pode estar aumentada (Nascimento 2004a).

5. Prevalência

Não há referências para predisposição entre raças, sexo ou idade, no entanto verifica-se que os machos são mais acometidos (Nascimento 2004), principalmente em relação a *M. haemominutum* (Aragão-de-Sousa 2013). Outros autores referem ou são de opinião que gatos do sexo masculino, jovens e coinfectados com FIV e/ou FeLV têm maior risco de estarem infetados com *M. haemofelis*, enquanto, *M. haemominutum* afeta mais machos idosos, com acesso ao exterior, sem raça definida e com infecção por FIV (Beugnet & Halos 2015).

A micoplasmose é uma doença que ocorre com distribuição mundial, sendo a prevalência de *M. haemofelis* de 15% (Quinn *et al.* 2011). Através de PCR a prevalência encontrada de *M. haemofelis* em gatos doentes que vão a consultas está entre 0,5 a 10%. Segundo outros autores 1 em cada 4 gatos estão infetados com *M. haemominutum* (Beugnet & Halos 2015).

A infecção ocorre com maior frequência na Primavera, em gatos com acesso ao exterior entre o 1 e 3 anos de idade (Quinn *et al.* 2011).

Verifica-se que o FeLV é cofator no desenvolvimento de anemia por este agente. Em locais onde o FeLV é comum verificou-se uma prevalência de cerca de 50% de gatos infetados com *M. haemofelis* (Quinn *et al.* 2011, Ramsey & Tennant 2010). Em relação ao FIV, não se verificou uma relação direta com infecção mas está documentado que 10% gatos com FIV estão co-infetados com este agente (Ramsey & Tennant 2010).

No Brasil em 2013, a prevalência de *M. haemominutum* era maior do que *M. haemofelis*, especialmente em gatos vadios. A coinfeção entre ambos os agentes não foi um achado comum

(Aragão-de-Sousa 2013). No entanto, num estudo em Saskatchewan e Alberta verificou-se que apesar de ambas as espécies serem identificadas, gatos doentes eram mais afetados por *M. haemofelis* (Kewish 2004).

Num estudo realizado em Itália em gatos urbanos com o auxílio do método de diagnóstico de PCR, 33,1% dos gatos estudados eram positivos a micoplasmas. Das amostras positivas 28 estavam infetados com *M. haemofelis* e 58 *M. haemominutum* e não foram detetadas coinfeções (Spada 2014). O estudo está em concordância com um trabalho prévio no Canadá onde não se verificaram também coinfeções dos vários agentes. Nesse estudo a prevalência encontrada de *M. haemofelis* 3,1% e de *M. haemominutum* 8,4% concluindo também que os gatos com este último agente tinham maior probabilidade de estarem infetados com retrovírus (FIV ou FeLV) do que os infetados com outros micoplasmas (Stojanovic & Foley 2011).

Na Coreia do Sul, realizou-se uma investigação para avaliar a potencial associação entre os diferentes tipos de habitat e a prevalência da infeção dos micoplasmas, FIV e FeLV. Nesse estudo, a taxa de infeção para micoplasmas foi superior em gatos de habitats rurais tendo sido *M. haemominutum* a espécie mais comum, seguido por *M. haemofelis* (Hwang *et al.* 2015).

Em Portugal, foi realizado um estudo recentemente em que a prevalência global de micoplasmas na população-alvo foi de 27,1%, em que 17,8% eram espécies *M. haemominutum* e 14,4% *M. haemofelis*. Detetou-se uma coinfeção de micoplasmas de 8,1% sendo mais comum a coinfeção entre os dois agente referidos anteriormente. A infeção por estes agentes foi mais em gatos do grupo do gatil. Não se evidenciou uma associação entre infeção por micoplasmas e localização geográfica, idade ou co-infeção pelo vírus da leucemia felina. Também a prevalência foi maior em gatos com infeção por FIV (Duarte *et al.* 2016).

6. Tratamento

O tratamento deve ser direcionado para a eliminação do micoplasma e diminuição dos sintomas por ele causados. Em primeiro lugar, é crucial limitar o “stress” ao qual o animal está sujeito, devendo-se por esse motivo fazer “cage rest” (Nascimento 2004).

Se houver uma anemia severa em que o valor VGM <15% deve-se proceder de imediato a uma transfusão de sangue total (Nascimento 2004).

Qualquer animal com sinais clínicos deve ser medicado com um antibiótico. O de eleição é a doxicilina durante 2 semanas, 10mg/kg PO SID (Beugnet & Halos 2015, Nascimento 2004, Rand 2006). Se o antibiótico for bem tolerado pelo paciente deve fazer-se um tratamento de duração total de 4 semanas (Rand 2006). Também se pode utilizar a tetraciclina em doses de 22mg/kg PO TID, no entanto a doxicilina demonstrou ser mais eficaz, deixando assim de se utilizar a tetraciclina (Rand 2006). Uma outra alternativa é a enrofloxacina na dose de 5 a 10 mg/kg PO a cada 12-24h. Pode também ser utilizada durante 2 a 3 semanas em gatos que são sensíveis a doxicilina (Rand 2006). Foi também recentemente comprovado que a pradofloxacina pode ser utilizada em alternativa ao antibiótico de primeira escolha, tendo o benefício de não causar atrofia da retina em gatos ao contrário da enrofloxacina (Beugnet & Halos 2015, Rand 2006).

Aos animais PCR positivos subclínicos não é recomendada a administração de antibiótico, uma vez que ainda não foi demonstrado que o tratamento com antimicrobianos elimine a infecção. Assim, não é aconselhável tratar pacientes positivos para serem utilizados como doadores de sangue (Beugnet & Halos 2015).

Gatos que sejam intolerantes tanto a doxicilina como a enrofloxacinina podem ser tratados com dipropionato de imidocarb numa dose de 5mg/kg IM ou SC a cada 2 semanas num total de 2 a 4 injeções (Rand 2006).

A prednisolona pode ser utilizada para diminuir a eritrofagocitose, aumentar o apetite e estimular a medula óssea (Nascimento 2004). Normalmente a dose é de 1-2 mg/kg PO BID, e deve ser utilizada pelo menos durante a primeira semana de tratamento principalmente por se tratar de uma doença imuno-mediada (Rand 2006). No entanto, o seu uso é contraditório podendo causar uma imunossupressão maior, exacerbando os sinais clínicos, pelo que certos autores defendem que apenas deverá ser utilizada em casos de pacientes que não respondam à terapêutica com antibiótico por si só, ou em casos em que o diagnóstico não é claro (Beugnet & Halos 2015).

Deve ser feito tratamento de manutenção, tal como fluidoterapia com soluções glicosadas intravenosas, garantir um bom aporte nutricional e caso seja necessário colocar uma sonda nasogástrica para alimentação. Os gatos infetados que são tratados ficam geralmente portadores mas não tem recidivas (Nascimento 2004).

II - OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo consiste na obtenção de informação sobre a coinfeção entre diferentes agentes infecciosos (FIV, FeLV e micoplasmas) em gatos na região norte de Portugal. Pretende-se avaliar os fatores de riscos para ocorrência de infecção, tentando perceber quais os grupos mais suscetíveis à exposição e desenvolvimento da doença, tendo em conta os fatores idade no momento do teste, expressão de sinais clínicos, sexo, plano de desparasitação e vacinação, habitat e proveniência do animal.

O presente estudo apresenta-se com duas vertentes finais: uma demonstrar a distribuição das doenças causadas pelos agentes FIV, FeLV e micoplasmas na região norte de Portugal; a outra, de caráter pedagógico, procura sensibilizar os proprietários da importância que estas doenças têm, qual o seu diagnóstico e quais as medidas profiláticas, uma vez que a maioria dos gatos se apresenta assintomático durante um elevado período de tempo, considerando que grande parte dos animais adotados provêm da rua.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1. População e amostra

A amostra neste estudo foi constituída por 128 felinos submetidos a recolha de sangue para posterior testagem de infeção com FIV e FeLV com o kit Urano Test FIV e FeLV e também para estudo molecular por PCR para deteção de micoplasmas. Os gatos foram divididos em dois

grupos: o primeiro integra gatos de interior e o segundo é composto por gatos recentemente adotados da rua ou gatos “*outdoor*”, ou seja, com acesso ao exterior. As condições em que o teste foi realizado foram variáveis: alguns gatos estavam saudáveis e sem parasitas externos, enquanto outros apresentavam sintomatologia consistente com FIV ou FeLV e/ou apresentavam grande parasitismo por pulgas.

Os animais a avaliar teriam mais do que 6 meses para evitar resultados falsos positivos nos testes de deteção de anticorpos de FIV, uma vez que até esta idade os anticorpos maternos podem ainda estar presentes no organismo do gatinho. Um teste realizado antes desta idade com resultado negativo não garante que tenha decorrido tempo suficiente para a seroconversão, enquanto um resultado positivo não significa que haja infeção por não distinguir anticorpos maternos, nem para antigénio FeLV. Apesar de um resultado negativo ser fidedigno, um resultado positivo poderá surgir em caso de virémia transitória. Um gato inserido nesta faixa etária deverá ser testado em intervalos de dois meses para FIV até aos seis meses. Adicionalmente, a bibliografia indica que gatos com menos de 16 semanas de idade apresentam maior probabilidade de ficarem persistentemente infetados por FeLV (Hartmann 2012).

Em relação à faixa etária os gatos foram agrupados em 4 grupos: juvenis - até 6 meses de idade; jovens - dos 6 meses a 1 ano; adultos – de 1 aos 7 anos; séniores - a partir dos 7 anos.

Nos animais recentemente adotados, dos quais não temos registos de idade, esta foi estimada com base na avaliação dentária.

Tanto gatos aparentemente saudáveis como doentes puderam ser integrados no estudo, e foram também incluídos animais de ambos os sexos.

O plano de vacinação foi também tido em conta, uma vez que o teste de diagnóstico não deve ser feito imediatamente após a vacinação para o FeLV, pois pode detetar antigénios virais vacinais levando a um resultado falso positivo. Está, no entanto, descrito que a vacinação não compromete o resultado do teste. O plano de desparasitação foi também considerado, uma vez que a bibliografia refere que uma transmissão de *M. haemofelis* ocorre através das pulgas (Beugnet & Halos 2015).

Numa primeira abordagem as amostras tinham sido pensadas para serem divididas em dois grupos: “gatos recentemente adotados” e “gatos indoor” incluindo neste último 2 subgrupos: gatos “*indoor*” e “*outdoor*”. No entanto, incluímos o subgrupo gatos “*outdoor*” nos gatos recentemente adotados. Esta divisão foi efetuada com o objetivo de perceber qual a prevalência e relação dos agentes infecciosos estudados em gatos que estão no exterior comparando com os gatos que vivem apenas no interior e que não tem acesso a outros gatos nem a possíveis fontes de contaminação. Seguindo esta ótica achou-se que seria mais pertinente inserir o subgrupo “*outdoor*” no grupo dos “gatos recentemente adotados” pois a prevalência da doença nestes irá dar-nos uma ideia da prevalência dos agentes no ambiente exterior.

Gatos recentemente adotados: gatos que tenham sido adotados há menos de 2 meses ao momento do teste, para assegurar que decorreu tempo suficiente para a ocorrência de seroconversão.

Gatos “indoor”: gatos que estão no interior de uma casa há mais de 2 meses sem acesso ao exterior em qualquer circunstância, sem contacto com gatos que não sejam co-habitantes normais.

A recolha de sangue dos gatos de ambos os grupos foi efetuada em colaboração de centros veterinários da zona norte do país (Anexo II), aquando da deslocação dos mesmos a fim de se submeterem a algum procedimento cirúrgico ou análises sanguíneas.

Em relação aos testes de FeLV, serão considerados animais positivos independentemente da infeção ser regressiva ou progressiva, uma vez que não é possível fazer esta distinção pela metodologia utilizada.

2. Material e Métodos

Para deteção de anticorpos de FIV e antígenos de FeLV utilizou-se o “kit” Uranotest FeLV-FIV. O fabricante indica uma sensibilidade para FeLV de 94% em relação a isolamento viral e para FIV 96% em relação a Western Blot. Em relação à especificidade para FeLV será de 99% em relação a isolamento viral e para FIV 98% em relação a Western Blot. Este teste consiste na deteção simultânea de antígenos específicos p27 para FeLV e anticorpos contra gp40 para FIV. É realizado com apenas 10 microlitros de sangue total ou plasma e a leitura é feita aos 10 minutos. Perante a possibilidade elevada de obtenção de resultados assertivos recorrendo apenas a um “kit”, realizado em apenas dois passos, minimizando assim a possibilidade de erros, justifica o seu uso rotineiro na prática clínica. O teste está disponível em caixas contendo 10 embalagens individuais e uma solução tampão de teste (Anexo I – Imagem V). Cada embalagem é constituída por uma pequena placa e uma pipeta, de utilização única. A placa exhibe dois mostradores, um que apresenta o resultado serológico para anticorpos FIV e outra que revela o resultado serológico para antígeno FeLV e, para cada um, um poço destinado à deposição de uma gota de plasma, soro ou sangue total, seguida de duas gotas da solução de tampão de teste, conforme indicado pelo fabricante.

Procedeu-se à recolha de cerca de 1mL de sangue em cada gato, puncionando a veia jugular ou braquial, dependendo da cooperação do animal (Anexo I – Imagem VI). Duas gotas de sangue total, diretamente da seringa foram aproveitadas para a realização do UranoTest FeLV-FIV, utilizando uma gota por cada poço (um para FIV outro para FeLV). Para além da gota de sangue em cada poço colocamos 2 gotas do reagente em cada um, conforme indicação do fabricante. Aguardou-se 10 minutos para fazer a leitura e observação dos resultados. Os testes são considerados válidos se surgir uma linha no controlo e tidos como positivos se adjacente a esta surgir outra linha, conforme é possível visualizar no anexo I, imagem VII. Se a linha de controlo estiver ausente, o teste é considerado inválido. A leitura de resultados em tempo superior aos 10 minutos é igualmente considerada inválida. No caso dos resultados duvidosos, o teste revela as

duas linhas, no entanto, a diagnóstica aparece de forma ténue. Neste caso requer que se faça uma confirmação em laboratório por teste ELISA. Para identificação de micoplasmas o método de diagnóstico utilizado foi a PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

O DNA foi extraído a partir das amostras de sangue periférico de cada animal, utilizando-se o *kit* de extração de DNA PUREGENE-Gentra, segundo o protocolo já estabelecido no laboratório de Imunogenética do ICBAS e baseado no recomendado pelo fabricante.

Para a detecção de *Mycoplasma haemominutum* utilizou-se os “*primers*” 1183F (5'-GCATAATGTGTC GCAATC - 3') e 1290R (5'- GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC -3') que amplificam parte do gene 16SrRNA. Este protocolo previamente descrito por Aragão-de-Sousa (2013). Foi otimizado procedendo ao acerto de algumas concentrações, provavelmente devido à utilização de outra *Taq*. A solução final para a amplificação continha 5µL de DNA teste, tampão NH₄⁺ 1x, 1,5mM MgCl₂, 0,5mM da solução mix de dNTP's, 0,5µM de cada “*primer*” e 0,04 unidades de BioTaq totalizando um volume final de 10µL.

Para realização da amplificação utilizou-se o seguinte programa de PCR: 94°C por 7 minutos seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos, num termociclador.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio (0,5mg/mL). Em cada PCR foi utilizado o DNA de um gato positivo a *M. haemominutum* como controle positivo, e como controle negativo foi utilizada água ultrapura. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pares de base (Anexo I – Imagem VIII).

Para a detecção de *Mycoplasma haemofelis* utilizaram-se os “*primers*” Hfelis-fl (5'-GACTTTGGTTTCGGCCAAGG -3') e Hfelis-r3 (5'- CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC-3'), que amplificam parte do gene 16srRNA. O PCR para detecção desta espécie de micoplasma foi realizado de forma exatamente igual à da espécie anterior, tendo sido necessário, também a realização de vários protocolos diferentes de forma a otimizar o protocolo corretamente.

3. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa IBM SPSS – versão 23, através do teste chi-quadrado para comparação das diferentes variáveis. Foi considerado significativo P <0,05.

IV - RESULTADOS

Dos 128 gatos incluídos no estudo, 69 (54%) eram fêmeas e 59 (46%) machos.

Quanto à distribuição da amostra em estudo, em relação à faixa etária, 31 (24%) eram jovens, 79 (62%) adultos, 17 (13%) sêniores e 1% a idade era desconhecida.

Segundo o estado fisiológico, 71 (55%) dos gatos eram esterilizados e 56 (44%) inteiros, para 1% não tínhamos qualquer informação relativamente a este parâmetro. Considerando o estilo de vida de cada gato, 65 (51%) eram gatos “*indoor*”, não tendo portanto em nenhuma circunstância acesso ao exterior. Para um dos gatos (1%) não foi fornecida informação relativamente a este parâmetro. Os restantes foram englobados no grupo “gatos recentemente adotados” (48%) onde

se inserem tanto gatos “*outdoor*” como gatos que tenham sido adotados ou recolhidos da rua há menos de 2 meses.

Em relação à profilaxia, 62 (48%) gatos estavam desparasitados externamente contra as pulgas, enquanto 47% não faziam essa desparasitação com a regularidade devida e 6 gatos (5%) não foi possível saber quando teria sido feita a última desparasitação externa. No que respeita à desparasitação interna 69 (54%) gatos estavam desparasitados internamente, enquanto 53 (41%) não faziam essa desparasitação com a regularidade devida e aos mesmos 6 gatos (5%) não foi possível saber quando teria sido feita a última desparasitação interna. Relativamente à vacinação “*core*” 2% dos gatos não foi possível saber se tinham as vacinas em dia, 46 (36%) gatos estavam vacinados e 80 (62%) gatos não.

Tendo em consideração a distribuição geográfica dos animais, 76 (59%) gatos eram do distrito de Braga, 51 (40%) do Porto e 1 de Viana do Castelo. Dentro de cada distrito tentou-se que as amostras fossem o mais representativa possível, e assim dessa forma conseguiu-se abranger uma vasta área geográfica. No Porto as amostras recolhidas pertenciam a gatos de várias áreas como pode ser visto em anexo (Anexo III).

Neste trabalho, relativamente à infeção por FIV, pode-se concluir que 85,7% dos positivos eram da raça Europeu comum e 14,3% tinham um cruzamento com siamês, não sendo esta análise significativa ($P=0,097$). Em relação à idade dos gatos com esta infeção, 100% eram adultos. Em relação ao sexo, 85,7% dos infetados eram machos e 14,3% fêmeas, com um $P=0,05$, sugerindo que há um risco 7,44 vezes maior de ser infetado com FIV se for macho. Relativamente à castração, 42,9% dos gatos eram castrados e 57,1% inteiros ($P=0,7$). Considerando a vacinação e desparasitações internas e externas não se verificam diferenças estatisticamente significativas.

Tendo em conta os diferentes grupos de estudo, apenas 14,3% dos gatos com FIV pertenciam ao grupo “*indoor*”, sendo que 85,7% dos gatos infetados integravam o grupo “recentemente adotado” ($P=0,058$). Sugere-se assim, que um gato recentemente adotado, ou seja, que esteja no exterior, tem 1,8 vezes maior probabilidade de estar infetado com FIV.

No que se refere a infeção por FeLV, as variáveis analisadas foram as mesmas. Em relação a raça, idade, desparasitações interna e externa, vacinação, castração e categoria (gato com dono ou recentemente adotado) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Considerando os gatos infetados com FeLV, todos (100%) eram machos ($P=0,1$).

Nos gatos infetados com *M. haemominutum* foram também avaliadas todas as variáveis anteriores. Quanto à raça, 87,5% são Europeus comuns e 14,3% têm um cruzamento da raça siamês. A idade, sexo, estado vacinal, desparasitações interna e externa, estado de fertilidade e categoria não tiveram resultados estatisticamente significativos.

Avaliando as coinfeções dos agentes verificou-se que nenhum gato era positivo a ambas as retrovírus nem positivo a FeLV e a *M. haemominutum*, 28,6% dos gatos eram positivos a FIV e a *M. haemominutum* ($P=0,21$).

V- DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos analisar o problema da coinfeção de FIV, FeLV e micoplasmas em gatos na região norte de Portugal.

No total das 128 amostras recolhidas, a prevalência de *Mycoplasma haemominutum* foi de 12% o que está próximo do valor descrito no estudo publicado mais recentemente (Duarte *et al.* 2016) em que 17,8% da população são positivos para esta espécie. No referido estudo, a população analisada era de 236 gatos da Zona Centro e Sul de Portugal.

Num estudo realizado no Norte e Centro de Portugal, a prevalência encontrada foi de 41% (Martínez-Díaz *et al.* 2013), a qual é superior ao observado no nosso trabalho. A área abrangida em Martínez-Díaz *et al.* foi mais vasta, sendo que a maior prevalência de infeção se encontrou na zona de Aveiro, zona da qual não obtivemos nenhuma amostra. Também é referido pelo autor que a maioria dos gatos seriam gatos de exterior, o que poderá ter influenciado na grande prevalência encontrada, uma vez que gatos de exterior estão mais expostos ao agente, segundo a bibliografia. Mundialmente a prevalência também é de 15% (Quinn *et al.* 2011b), no entanto alguns autores referem que 1 em cada 4 gatos atendidos em hospitais e clínicas veterinárias estão infetados (Beugnet & Halos 2015). No estudo de Duarte *et al.* (2016) um dos fatores que se associava à infeção de *M. haemominutum* seria a coinfeção por FIV, o que está de acordo também com o observado no nosso trabalho que revela que 28,6% dos gatos estão coinfetados por ambos os agentes, em concordância também com a bibliografia (Beugnet & Halos 2015). Pelo contrário, não existe qualquer relação com a positividade a FeLV tal como na nossa amostra. Em relação a idade, sexo, estado vacinal, desparasitações externas e internas não se observaram resultados estatisticamente significativos, estando em concordância com Duarte *et al.* (2016). No entanto, Beugnet e Halos (2015) referem que esta espécie de micoplasma afeta mais machos idosos, com acesso ao exterior, sem raça definida. O grupo aqui definido como “recentemente adotados” parece não ter relação com a prevalência da infeção, não confirmando a bibliografia. O pequeno tamanho da amostra poderá no entanto estar a determinar a não existência de um resultado estatisticamente significativo. O único fator que parece ter relação com a infeção por *M. haemominutum* é a raça, uma vez que 87,5% dos infetados são Europeus comuns, ou seja, os gatos sem *pedigree*, no entanto, é de notar que a nossa amostra é constituída por 98% de gatos desta raça o que poderá ter alguma influência.

Em relação à infeção por FIV, a prevalência encontrada na região norte de Portugal foi de 6%, o que está de acordo com as prevalências descritas em estudos anteriores variam entre 2,7% a 18%, tendo vindo esta prevalência a diminuir de ano para ano (Rosado, 2009, Duarte 2010, Fernandes 2015). Na Moita foi realizado também uma amostragem em que a prevalência seria de 22% (Turras 2014). No entanto, uma vez que este estudo foi feito só num gatil com animais errantes, seria de esperar haver uma maior prevalência. A prevalência observada está também em concordância com prevalências noutros países como nos EUA em que ronda os 3,5 a 24% dependendo se são gatos com ou sem sinais clínicos e em Madrid 8,3% (Rand 2006). Em Itália

há também uma maior prevalência que chega aos 30%, que poderá ser explicada também pelo número de animais errantes que foram utilizados para o estudo (Bandecheii *et al.* 2006). A idade parece ser um fator de risco, uma vez que 100% dos gatos FIV positivos da nossa amostra eram adultos, ou seja, estavam situados numa faixa etária do 1 aos 7 anos de idade, estando em concordância com Rodrigues (2012). Esta prevalência em gatos de maior idade pode ser explicada pela sua longa fase assintomática, o que faz com que os gatos sejam levados às clínicas veterinárias já apresentando sintomas patognomónicos de FIV. A amostra deste estudo foi totalmente aleatória, englobando tanto gatos com como sem sinais clínicos, o que não invalida que se aplique a mesma teoria uma vez que para se apresentarem à clínica veterinária para a realização de exames, momento em que seria oportunamente aproveitado uma parte deste sangue para o estudo, a grande maioria era levada pelos proprietários por alguma suspeita. Também ainda em relação ao FIV, na nossa amostra 85,7% eram machos, o que está de acordo tanto com a bibliografia como com estudos anteriormente realizados (Turras 2014). Pode-se considerar o sexo como um fator de risco para infeção por FIV uma vez que o risco de um macho vir a ter esta doença é 7,44 vezes maior do que uma fêmea. Também segundo os resultados deste trabalho, o grupo “recentemente adotados” tem uma maior prevalência (85,7%), o que está de acordo com a bibliografia, tendo em consideração que neste grupo foram colocados todos os gatos que estariam ou teriam estado na rua até um máximo de 2 meses antes da colheita. Os machos que andam no exterior são os mais afetados, pois frequentemente se envolvem-se em lutas com outros gatos que podem estar infetados e acabam por funcionar como fonte de contaminação. Considera-se, portanto, que o acesso ou não ao exterior seja um fator importante de risco para infeção por FIV. Um gato que tem acesso ao exterior ou vive no exterior, tem 1,83 mais vezes probabilidade de ser FIV positivo do que um gato que viva apenas no interior. Por último, o estado de fertilidade é também um fator determinante. Na nossa amostra 57,1% dos gatos eram inteiros. De acordo com a bibliografia, machos inteiros têm maior probabilidade de serem infetados pelas razões anteriormente referidas.

Relativamente à infeção por FeLV, na nossa amostra o único fator determinante foi o sexo, sendo que a totalidade dos gatos infetados eram machos. No entanto, alguns autores defendem não existir qualquer relação entre a prevalência e o género (Hosie *et al.* 1989, Levy *et al.* 2006, Bande *et al.* 2012), sendo que os estudos anteriormente realizados no nosso país estão de acordo com a nossa observação (Rodrigues 2012, Fernandes 2015). Apenas 3 gatos (2%) foram positivos. Segundo Fenner *et al.* (1993) a prevalência de virémia está situada entre 1 a 2%, ainda que a prevalência de infeção chegue aos 40%. Isto porque a patogenia do FeLV é peculiar e grande parte dos gatos infetados adultos têm uma maior resistência, passando assim, por infeções regressivas ou abortivas conseguindo reverter a virémia. Os testes serológicos que utilizamos não detetam se estes terão passado a fase de virémia (Ramsey & Tennant 2010). Também esta prevalência é inferior à de outros estudos efetuados em Portugal, que variam entre 5,7 e 10% (Duarte 2010, Rosado 2009, Turras 2014).

Tendo em conta os dois grupos de animais do estudo propostos inicialmente, podemos observar que a única diferença em relação a estudos já efetuados é a infeção por FeLV, uma vez que gatos que estão ou vieram recentemente do exterior têm um maior risco de se virem a infetar com este vírus. No entanto, esperávamos que houvesse e se verificasse uma maior prevalência no grupo “recentemente adotados” onde foram incluídos todos os gatos retirados da rua há menos de 2 meses e também os gatos com estilo de vida “outdoor”.

Não foi possível a realização dos PCRs para deteção de *Mycoplasma haemofelis*, dado que após várias repetições, a amostra que serviria como controlo positivo resultou sempre em negativo (Imagem IX - anexo I).

O nosso controlo positivo foi obtido a partir de uma amostra de sangue recolhida a um gato que tinha testado positivo para *M. haemofelis* duas semanas antes.

Esta amostra sujeita ao nosso método de PCR indicou um resultado negativo pelo que se levantaram dúvidas sobre a positividade da amostra ou a falha do protocolo. Depois de sujeitar a dita amostra a várias repetições o resultado continuou a ser negativo, pelo que se decidiu enviar a amostra novamente para o laboratório inicial para reconfirmar o resultado, o qual veio negativo.

Várias hipóteses se podem colocar: o gato estava numa fase de infeção em que fosse negativo a PCR; o gato foi medicado sem o conhecimento do médico veterinário que o seguia, pois caso o animal estivesse a fazer um antibiótico como por exemplo a doxicilina, o gato torna-se PCR negativo desde o início da toma e durante todo o período de tratamento, podendo voltar a ser positivo entre 3 a 5 semanas após o término (Tasker & Lappin 2002); pode ter ocorrido erro humano na identificação da amostra ou do animal, ou manipulação da amostra desde a colheita até ao processamento, tanto na primeira recolha como na segunda. Como a prevalência de *Mycoplasma haemofelis* em Portugal e no mundo é inferior à de *M. haemominutum* é mais raro encontrar um gato positivo a este micoplasma, como tal não conseguimos encontrar nenhum gato positivo para além do referido. Pelas razões apresentadas não conseguimos ter dados relativos a esta parte da investigação.

Devido ao número pequeno de amostra, os resultados obtidos podem ser diferentes do que seriam se o “n” fosse maior. No entanto, grande parte dos nossos resultados estão de acordo com a bibliografia e trabalhos realizados anteriormente.

Apesar de existirem alguns estudos epidemiológicos sobre a prevalência de FIV, FeLV e micoplasmas hemotrópicos em Portugal, na sua maioria incidindo sobre populações de gatos errantes, têm sido realizados na zona Centro e Sul de Portugal. O presente estudo apresenta-se como pioneiro na zona Norte, sendo de grande relevância para compreender as diferenças e semelhanças das prevalências e coinfeções dentro do país.

VI – CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos, e tendo em conta os estudos prévios existentes, a infeção por FIV apresenta maior prevalência do que por FeLV. A diferença entre prevalência de infeção e virémia poderá ser um fator chave, pois através do método de diagnóstico utilizado apenas é possível detetar antigénios em gatos virémicos e não em gatos com infeção regressiva que foram infetados. Observou-se ainda que tanto no caso do FIV como do FeLV, os animais mais afetados eram machos. Na infeção por FIV o animal ter acesso ao exterior confere um risco mais elevado de ser infetado, contrariamente ao verificado para FeLV. O facto de o animal não estar esterilizado é também um fator de risco para a infeção por FIV, não parecendo influenciar a transmissão de FeLV.

A prevalência de *Mycoplasma haemominutum* é de 12%, sendo inferior às reportadas em estudos anteriores. Parece haver uma relação entre infeção por este agente e a raça, sendo o “Europeu Comum” mais afetado. Gatos infetados com este micoplasma têm uma maior probabilidade de serem positivos para FIV, não parecendo existir qualquer relação com FeLV. Da mesma maneira, não parece existir qualquer relação de coinfeção entre as duas retrovírus estudadas.

É importante que se continue a fazer estudos epidemiológicos em todas as zonas de Portugal Continental, se possível com um maior número de amostras de forma a obtermos uma prevalência real de cada zona geográfica e dos diferentes tipos de ambiente em que vivem os gatos (gatis, “indoor”, “outdoor”, animais errantes). Desta forma será possível relacionar as diferentes prevalências direcionando medidas profiláticas.

Por fim, é ainda importante advertir para que no momento da adoção de gatos, quer seja através de associações ou recolhidos da rua, estes deverão ser testados para a FIV e FeLV, para que caso testem positivo possam ser tomadas determinadas medidas a fim de reduzir o risco de contágio para gatos negativos e proteger o animal positivo de “stress” e possíveis infeções.

VII – BIBLIOGRAFIA

Addie DD, Dennis, JM, Toth S, Callanan JJ, Reid S, Jarrett O (2000) “Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency vírus” **Veterinary Record** 146 (15), 419-424.

Ammersbach M, Bienzle D (2011) “Methods for assessing feline immunodeficiency virus infection, infectivity and purification” **Veterinary Immunology and Immunopathology** 143 (3), 202-214.

Aragão-de-Sousa SKN, Sampaio-Junior FD, Sousa LO, Santos RC, Gonçalves EC, Scofield A, Góes-Cavalcante G (2013) “Diagnóstico molecular da infecção por hemoplasmas em gatos domésticos naturalmente infectados da cidade de Belém, Pará” **Pesquisa Veterinária Brasil** 33 (9), 1116-1120.

- Bande F, Arshad S, Hassan L, Zakaria Z, Sopian N, Rahman N, Alazawy A (2012) "Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia" **BMC Veterinary Research** 8 (1), 1.
- Bandecchi P, Dell'Omodarme M, Magi M, Palamidessi A, Prati MC (2006) "Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination" **Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association** 158 (16).
- Bendinelli M, Pistello M, Lombardi S, Poli A, Garzelli C, Matteucci D, Ceccherini-Nelli L, Malvaldi, G, Tozzini F (1995) "Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen" **Clinical Microbiology Review** 8, 87-112.
- Beugnet F, Halos L (2015) "Vector Borne Diseases of Cats" **Parasitoses & Vector Borne Diseases of Cats**, 1ª Ed, Merial, 250-257.
- Bienzle D, Little S, Ammersbach M (2013) "Preliminary evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection" **Journal of Feline Medicine and Surgery** 15 (8), 725-729.
- Callanan JJ, Jones BA, Irvine J, Willet BJ, McCandlish IA, Jarrett O (1996) "Histological classification and immunophenotype of lymphosarcomas in cats with naturally and experimentally acquired feline immunodeficiency virus infections" **Veterinary Pathology** 33, 264-272.
- Coats KS (2005) "The feline immunodeficiency virus-infected cat: a model for lentivirus-induced placental immunopathology and reproductive failure (mini-review)" **American Journal of Reproductive Immunology** 54, 169-185.
- Del Fierro GM, Meers J, Thomas J, Chadwick B, Park HS, Robinson WF (1995) "Quantification of lymphadenopathy in experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in domestic cats" **Veterinary Immunology and Immunopathology** 46, 3-12.
- Duarte A, Castro I, Fonseca I, Almeida V, Carvalho L, Meireles J, Fazendeiro M, Tavares L, Vaz Y (2010) "Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal" **Journal of Feline Medicine and Surgery** 12 (6), 441-446.
- Duarte A, Marques V, Correia JHD, Neto I, São Bráz B, Rodrigues C, Tavares L (2016) "Molecular detection of haemotropic Mycoplasma species in urban and rural cats from Portugal" **Journal of Feline Medicine and Surgery** 17 (6), 516-522.
- Ettinger S, Feldman E (2010) "Viral - Feline" **Textbook of Veterinary Internal Medicine**, 7ª Ed, volume 1, Elsevier, 929 – 939.
- Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO (1993) "Retroviridae" **Veterinary Virology**, 2º Ed, Academic Press, 561- 594.
- Fernandes APRP (2016) "Prevalência do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e do vírus da leucemia felina (FeLV) e fatores de risco associados à seropositividade em gatos domésticos do Distrito de Lisboa" **Universidade de Trás-Os-Montes e Alto-Douro**.

- Gómez N, Guida N (2010) **Enfermedades Infecciosas de los Caninos y Felinos** 1ª Ed, Inter-Médica, 353 – 414.
- Hartmann K (2012) “Clinical aspects of feline retroviruses: a review” **Viruses** 4 (11), 2684-2710.
- Hartmann K (2015) “Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats What does the current literature tell us?” **Journal of Feline Medicine and Surgery** 17 (11), 925-939.
- Harvey JW (2006) “Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis)” **Infectious Diseases of Dog and Cat**, 3ª Ed, Saunders Elsevier, 252-265.
- Hosie M, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Horzinek M (2009) “ABCD guidelines on feline immunodeficiency virus” **Journal of Feline Medicine and Surgery** 11, 575-584.
- Hosie MJ, Robertson C, Jarrett O (1989) “Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom” **The Veterinary Record** 125, 293-97.
- Hwang J, Gottdenker N, Min MS, Lee H, Chun MS (2015) “Evaluation of biochemical and haematological parameters and prevalence of selected pathogens in feral cats from urban and rural habitats in South Korea” **Journal of Feline Medicine and Surgery** 18 (6), 443 – 451.
- Kakinuma S, Motokawa K, Hohdatsu T, Yamamoto J, Koyama H, Hashimoto H (1995) “Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes” **Journal of Virology**, 69, 3639-3646.
- Kewish KE, Appleyard GD, Myers SL, Kidney BA, Jackson ML (2004) “Mycoplasma haemofelis and Mycoplasma haemominutum detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta” **Canadian Veterinary Journal**, 45 (9), 749-752.
- Levy J, Crawford C, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Little S, Sundahl E, Thayer V (2008) “American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines” **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 10 (3), 300-316.
- Levy JK, Scott HM, Lachtara JL, Crawford PC (2006) “Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity” **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 228 (3), 371-376.
- Litster AL (2014) “Transmission of feline immunodeficiency virus (FIV) among cohabiting cats in two cat rescue shelters” **Veterinary Journal**, 84-87.
- Little SE (2012) “Infectious Diseases” **The Cat: Clinical Medicine and Management**, 1ª Ed, Elsevier, 1056 – 1061.
- Lutz H, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Marsilio F (2009) “Leucemia felina. Diretrizes da ABCD em matéria de prevenção e gestão” **Journal of Feline Medicine & Surgery**, 11 (7), 565-574.
- MacDonald K, Levy JK, Tucker SJ, Crawford PC (2004) “Effects of passive transfer of immunity on results of diagnostic tests for antibodies against feline immunodeficiency virus in kittens born

to vaccinated queens” (abstract) **Journal of American Veterinary Medical Association** 225, 1554-1557.

Martínez-Díaz VL, Silvestre-Ferreira AC, Vilhena H, Pastor J, Francino O, Altet J (2013) “Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction” **Journal of Feline Medicine Surgery**, 15, 879–885.

Melo FAC, dos Santos AC, Nogueira K, da Cunha Barreto-Vianna AR, de Lima EMM (2015) “Cats Infected by Feline Leukemia Virus—Morpho-Quantitative Evaluation of the Thymus” **Open Journal of Animal Sciences**, 5(03), 277.

Nascimento F (2004) **O Paciente Felino – Tópicos Essenciais de Diagnóstico e Tratamento** 2ª Ed, Manole, 244 – 302.

O'brien SJ, Troyer JL, Brown MA, Johnson WE, Antunes A, Roelke ME, Pecon-Slaterry J (2012) “Emerging viruses in the Felidae: shifting paradigms” **Viruses**, 4 (2), 236-257.

O'Neil LL, Burkhard MJ, Diehl LJ, Hoover EA (1995) “Vertical transmission of feline immunodeficiency vírus” **AIDS Research and Human Retroviruses**, 11(1), 171-182.

O'Neil LL, Burkhard MJ, Hoover EA (1996) “Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats” **Journal of Virology** 70, 2894-2901.

Poli A, Tozon N, Guidi G, Pistello M (2012) “Renal alterations in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: a natural model of lentivirus-induced renal disease changes” **Viruses**, 9, 1372-89.

Quinn P, Markey B, Leonard F, Fitzpatrick E, Fanning S, Hartigan P (2011) **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**, 1ª Ed, Wiley-Blackwell, 373 – 634.

Ramsey IK, Tennant BJ (2010) “Sistema linfopoético e linforeticular ” **BSAVA – Manual de Doenças Infeciosas em Cães e Gatos**, 2ª Ed, Roca, 87 – 70.

Rand J (2006) **Problem-Based Feline Medicine** 3ª Ed, Elsevier, 299 – 501.

Richards JR (2005) “Feline immunodeficiency virus vaccine: implications for diagnostic testing and disease management” **Biologicals** 33 (4), 215-217.

Rodrigues C (2012) “Prevalência de Vírus da Imunodeficiência Felina, Vírus da Leucemia Felina, Calicivírus Felino, Herpesvírus Felino Tipo I e Candida spp em Felinos Errantes e possível associação a Gengivo-estomatite Felina e Doença Respiratória Felina” **Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa**.

Rosado R (2009) “Rastreamento virológico de carnívoros errantes e caracterização genética viral” **Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa**.

Slater M, Crawford P, Levy J (2005) “Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency vírus infection in cats” **Journal of the American Veterinary Medical Association** 226, 1530-1506.

Sodora D, Schpaer E, Kitchell B, Dow S, Hoover E, Mullins J (1993) “Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns” **Journal of Virology** 68, 2230-2238.

Spada E, Proverbio D, Galluzzo P, Della Pepa A, Bagnagatti De Giorgi G, Perego R, Ferro E (2014) "Prevalence of haemoplasma infections in stray cats in northern Italy" **ISRN Microbiology**.

Stojanovic V, Foley P (2011) "Prevalência de doenças infecciosas em uma população de gatos selvagens em Prince Edward Island, Canadá" **O Jornal Canadian Veterinary** 52 (9), 979.

Tasker SLMR, Lappin MR (2002) "Haemobartonella felis: recent developments in diagnosis and treatment" **Journal of Feline Medicine and Surgery** 4 (1), 3-11.

Tenorio AP, Franti CE, Madewell BR, Pedersen NC (1991) "Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calici-, immunodeficiency, or leukemia viroses" **Veterinary Immunology and Immunopathology** 29 (1-2), 1-14.

Turras MCCD (2014) "Estudo da prevalência de FIV/FelV numa população de 88 gatos errantes da região metropolitana de Lisboa" **Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Lusófona**.

Watanabe S, Kawamura M, Odahara Y, Anai Y, Ochi H, Nakagawa S, Nishigaki K (2013) "Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene" **PloS One**, 8 (4), e61009.

Weaver CC, Burgess SC, Nelson PD, Wilkinson M, Ryan PL, Nail CA, Kelly-Quagliana KA, May ML, Reeves RK, Boyle CR, Coats KS (2005) "Placental immunopathology and pregnancy failure in the FIV-infected cat" **Placenta**, 26, 138-47.

White J, Stickney A, Norris J (2011) "Feline immunodeficiency virus: disease association versus causation in domestic and nondomestic felids" **The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice**, 1197-1208.

ANEXO I



Imagem I – Gato FeLV positivo com um abscesso SC (esquerda); Gato FeLV positivo com uma infecção respiratória crónica (Imagem da autoria de Patrícia Azevedo).



Imagem II – Gato FIV e FeLV positivo com estomatite (Imagem da autoria de Patrícia Azevedo).



Imagem III – Distribuição mundial dos subtipos de FIV (Imagem de Hosie *et al.* 2009).

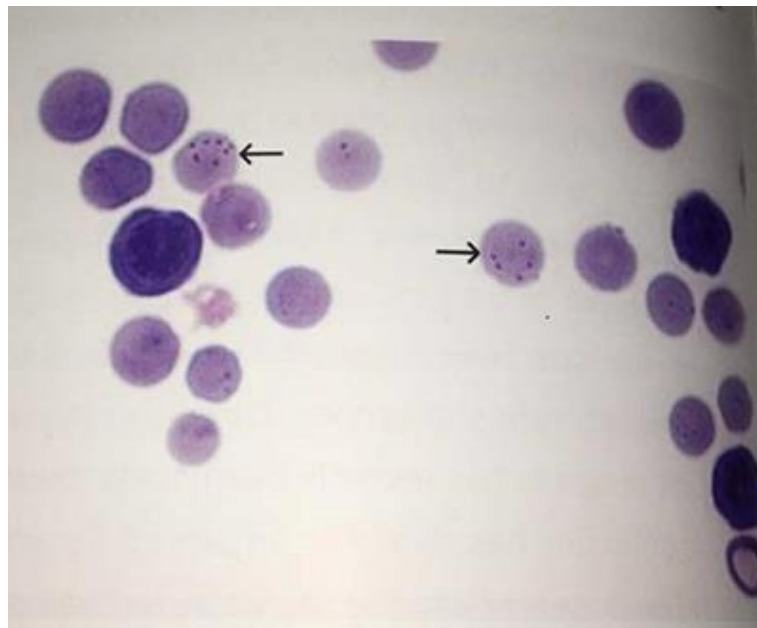


Imagem IV - Esfregaço sanguíneo corado com Romanowsky, demonstrando *M. haemofelis* nas bordas de um eritrócito (setas). É possível também observar numerosos eritrócitos grandes e nucleados – normoblastos (Imagem de Beugnet & Halos 2015).



Imagem V: Solução tampão/ reagente do *kit* UranoTest FeLV/FIV (Imagem da autoria de Patrícia Azevedo).



Imagem VI: Tubo de recolha com EDTA e teste Urano Fiv e FeLV realizado num gato do estudo (Imagem da autoria de Patrícia Azevedo).



Imagem VII: Kit Urano Test FIV e FeLV. A azul estão as riscas de controle e a verde as riscas que indicam que o animal é positivo a ambas as doenças (Imagem da autoria de Patrícia Azevedo).

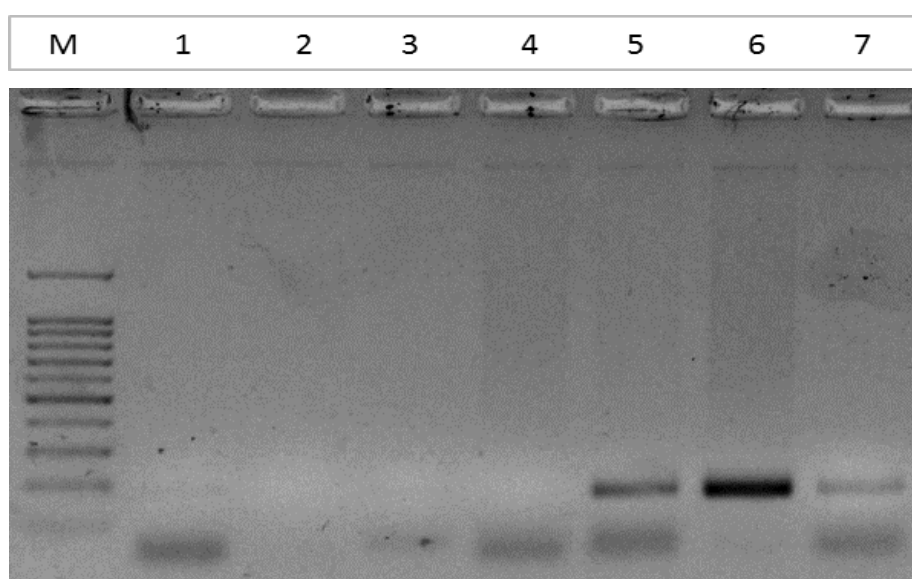


Imagem VIII: PCR de *M. haemominutum* em gel de agarose a 1%. M – marcadores moleculares de 100 bp; 1,2,3 e 4 – amostras negativas; 5 – amostra positiva (192 bp); 6 – controlo positivo (192 pb); 7 – branco (água) com contaminação.

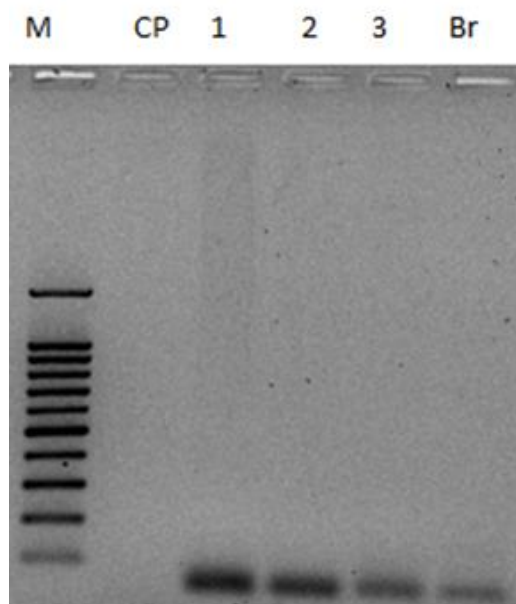


Imagem IX: Um dos protocolos de PCR de *M. haemofelis* efetuados, em gel de agarose a 1%. M – marcadores moleculares de 100bp; CP – controlo positivo sem nenhuma marca positiva em 393 pb; 1, 2 e 3 – amostras negativas; Br – branco (água).

ANEXO II

| | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| Centro Veterinário de Adaúfe | Clínica Veterinária da Avenida | Clínica Veterinária de Serralves | Clínica Veterinária do Campo Alegre | Clinica Veterinária Dr.ª Graziela Ramos |
| Clínica Veterinária do Carandá | Centro Hospitalar Veterinário | Hospital Veterinário Montenegro | Hospital Veterinário Ani Mar | UpVet |
| Clínica Veterinária Bracara Augusta | Clínica Veterinária Monte dos Burgos | Clínica Veterinária Arca D'Água | Clínica Veterinária VetOlival | - |
| Clínica Veterinária de Tebosa | Clínica dos Gatos | Hospital Veterinário de Braga | Hospital Veterinário de Vila do Conde | - |

Tabela I: Clínicas, centros e hospitais veterinários que colaboraram com o estudo.

ANEXO III

| Zona | Nº amostras |
|----------------------|-------------|
| Adaúfe | 1 |
| Barcelos | 4 |
| Braga Centro | 4 |
| Campo alegre | 1 |
| Carandá | 4 |
| Celeirós | 1 |
| Couto de Cambeses | 1 |
| Cunha | 1 |
| Custóias | 1 |
| Esposende | 4 |
| Fafe | 4 |
| Fraião | 5 |
| Frossos | 3 |
| Gaia | 2 |
| Gondomar | 1 |
| Gualtar | 3 |
| Guimarães | 1 |
| Guizande | 1 |
| Lamações | 1 |
| Lavra | 9 |
| Leça da Palmeira | 2 |
| Lomar | 4 |
| Maia | 1 |
| Maximinos | 7 |
| Porto centro | 10 |
| Póvoa de Varzim | 5 |
| Ramalde | 7 |
| Real | 1 |
| Ribeira | 1 |
| Rio Tinto | 1 |
| S. Vicente | 1 |
| S. Vitor | 5 |
| Sé | 9 |
| Senhora Da Hora | 3 |
| Serralves | 2 |
| St. Estevão de Penso | 2 |
| St. Tecla | 3 |
| Tenões | 1 |
| Vale Formoso | 1 |
| Valongo | 1 |
| Viana do Castelo | 1 |
| Vila do Conde | 6 |
| Vila verde | 1 |
| Vilaça | 1 |

Tabela II: Distribuição geográfica por zonas das amostras.